

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2006

THESE

Pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en Médecine Interne

Par

Olivier GROSSI

Né le 8 Avril 1967 à Lannion

présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2006

**Évaluation de l'efficacité d'une suspension de
bactériophages anti-staphylococciques
Corrélation *in vitro-in vivo***

Président : M le Professeur Raffi F. PU-PH Maladies Infectieuses

Directeur de Thèse : Mme Caillon J. MCU-PH Microbiologie

Examineurs : M le Professeur Potel G. PU-PH Thérapeutique

M le Professeur Hamidou M. PU-PH Médecine Interne

M Debarbieux L. Attaché de Recherche Institut Pasteur, Paris

TABLE DES MATIÈRES

I Introduction.....	3
II Les Bactériophages.....	5
2.1 Définition et structure des bactériophages.....	5
2.1.1 Définition.....	5
2.1.2 Structure.....	5
2.2 Taxonomie.....	10
2.2.1 Histoire de la taxonomie phagique.....	10
2.2.2 Taxonomie contemporaine.....	11
2.3 Habitat.....	14
2.3.1 Cibles bactériennes.....	14
2.3.2 Niches écologiques et interactions phage-bactérie.....	15
2.4 Cycles phagiques.....	16
2.4.1 Le cycle lytique.....	16
2.4.2 Les autres cycles.....	22
2.5 Histoire de la phagothérapie.....	23
2.5.1 1917-1941: Grandeur et décadence.....	25
2.5.2 1941-1980: A l'Ouest rien de nouveau.....	33
2.5.3 Des années 80 à nos jours: La redécouverte.....	37
III Objectifs du travail.....	44
IV Matériels et Méthodes.....	45
4.1 Suspension de bactériophages.....	45
4.2 Étude de l'activité <i>in vitro</i> de la suspension de phages sur <i>Staphylococcus aureus</i> ...	46
4.2.1 Spectre d'activité.....	47
4.2.2 Spécificité anti- <i>Staphylococcus aureus</i>	47
4.2.3 Titration de la suspension de phage par la méthode « en double couche ».....	48
4.2.4 Étude de l'activité lytique en milieu liquide.....	49
4.3 Activité lytique des phages dans des caillots de fibrines infectés.....	51
4.3.1 Prérogatives.....	51
4.3.2 Préparation des caillots de fibrine infectés.....	52
4.3.3 Détermination de la croissance bactérienne dans les caillots de fibrine.....	52
4.3.4 Mesure de l'activité de la suspension de phages dans les caillots de fibrine.....	52
4.4 Évaluation de l'efficacité de la suspension de phages <i>in vivo</i> dans des modèles expérimentaux.....	53
4.4.1 Souches bactériennes et préparation des inocula.....	54
4.4.2 Bactériophages.....	54
4.4.3 Antibiotiques.....	54
4.4.4 Modèles expérimentaux.....	54
4.4.5 Cinétiques des phages.....	57
4.4.6 Analyses statistiques.....	58
V RESULTATS.....	58
5.1 Activité <i>in vitro</i> de la suspension de phages sur <i>S. aureus</i>	58
5.2 Activité lytique des phages dans les caillots de fibrines infectés.....	64
5.3 Évaluation de l'activité de la suspension de phages <i>in vivo</i>	66
VI Discussion.....	69
VII Conclusion et perspectives.....	75
Références bibliographiques.....	76
Liste des figures.....	86
Liste des photos.....	87
Annexe.....	88

/ Introduction

À la fin du XIX ième siècle, le Dr Hankin, alors missionné aux Indes, fut intrigué par un étrange phénomène épidémiologique observé sur les rives de deux grands fleuves indiens. Animé d'un remarquable esprit d'investigation, celui-ci fit la démonstration des vertus antibactériennes des eaux de ces deux fleuves, et plus étonnant encore, de leurs propriétés prophylactiques contre le choléra [1].

Pour les spécialistes des phages, ce travail est le premier témoignage scientifique de l'existence de ces virus de bactéries et de leur potentiel en thérapeutique antibactérienne. Néanmoins, il a fallu attendre plus de vingt années pour que l'existence de ces agents soit démontrée *in vitro*. Les deux décennies qui suivirent furent une période faste en études et travaux sur ce « principe lytique » de bactéries. Ils furent l'occasion de joutes intellectuelles opposant quelques-uns des plus grands scientifiques de l'époque. Compte tenu des moyens techniques alors disponibles, la détermination de leur nature ou de leur qualité comme thérapeutique antibactérienne fut impossible.

À l'aube du deuxième conflit mondial, deux événements majeurs mirent un point final à tout débat; La nature virale des phages fut démontrée grâce à la microscopie électronique et la science venait de découvrir l'antibactérien incontestable: les antibiotiques. Bien que son agonie fut progressive, et se prolongea encore quelques années, il en était fini de la phagothérapie.

Au début des années quatre-vingt, cette thérapeutique antibactérienne obsolète, connut un regain d'intérêt en Occident. En effet, confrontés aux échecs de l'antibiothérapie, les Occidentaux, profitant de l'effondrement du bloc soviétique, découvrirent que cette autre partie du Monde avait continué à utiliser les bactériophages dans le traitement des infections bactériennes. Rodés à la fabrication et à l'utilisation de produits phagiques depuis les années trente, les thérapeutes de l'ancien bloc de l'Est les utilisaient comme substitut à l'antibiothérapie, et n'hésitèrent pas à y recourir dans le traitement d'infections à germes multirésistants.

À l'Ouest (principalement en Amérique du Nord) où le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques préoccupe toutes les grandes instances sanitaires, de plus en plus de scientifiques pensent que la phagothérapie pourrait être une solution à cette impasse thérapeutique. De nombreuses publications internationales témoignent de cet intérêt grandissant. Cet enthousiasme est porté par les résultats prometteurs de quelques travaux de recherche en particulier chez l'animal.

À l'heure actuelle, en France, pays qui partagea pourtant la co-découverte de ces virus, la phagothérapie ne semble pas éveiller beaucoup de curiosité.

Afin de nous faire notre propre opinion sur cette thérapeutique oubliée, nous nous sommes procuré des phages thérapeutiques dans un des pays où leur usage est quotidien. Notre travail avait comme objectif d'évaluer *in vitro*, puis *in vivo* dans deux modèles expérimentaux, les capacités lytiques d'une suspension de phages anti-staphylococciques commercialisée en Russie.

Nous ferons tout d'abord un rappel sur les caractéristiques biologiques des bactériophages.

Puis nous ferons un rappel historique sur l'utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques.

Ensuite nous exposerons les travaux réalisés *in vitro*, dans les caillots de fibrine et *in vivo* dans des modèles expérimentaux.

Dans la dernière partie, nous discuterons les résultats et des perspectives.

II LES BACTERIOPHAGES

2.1 DEFINITION ET STRUCTURE DES BACTERIOPHAGES

2.1.1 Définition

Les bactériophages ou phages sont des virus dont les cibles de multiplication exclusives sont des cellules procaryotes bactériennes. Ces virus appartiennent eux-mêmes au phylum des acaryotes, c'est-à-dire des éléments biologiques défectifs non cellulaires et dépourvus de noyau.

2.1.2 Structure

Morphologie

Les virions (particules virales) des phages sont constitués de deux éléments constants: un *acide nucléique* (ADN ou ARN) support de l'information génétique, et une structure protéique entourant et protégeant ce dernier : la *capside*. L'association de l'acide nucléique et de la capsidie forme la *nucléocapside*. Un troisième élément synonyme de fragilité, l'enveloppe, entoure parfois la capsidie [2].

Génome phagique

Le génome contient, comme pour les autres virus, l'ensemble des informations génétiques nécessaires à la multiplication de la particule phagique. Il est le support des gènes codant pour les protéines de structure et les protéines non structurales. Sa composition biochimique est un des critères majeurs de différenciation et de classification des virus. Il est constitué d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN). On distingue quatre grandes organisations génomiques chez les phages: ADN bicaténaire (linéaire ou circulaire) principalement, ou ADN monocaténaire et ARN bicaténaire ou monocaténaire. La taille et le nombre de gènes qui le composent sont directement liés à la complexité morphologique de la particule virale. La capacité de codage varie de quelques centaines de paires de bases pour les phages à ARN de la famille des Cystoviridae à plusieurs centaines de kb pour les phages les plus complexes de la famille des Myoviridae (phages caudés contractiles à ADN) comme le phage G (480 000 pdb) [2-4].

Comme nous le verrons dans les lignes suivantes, les espèces de phages sont extrêmement nombreuses (plus de 5000 dénombrées actuellement. À l'heure actuelle, environ 200 génomes phagiques ont été séquencés.

Capside

Pour la plupart des biologistes qui ne s'y intéressent que de très loin, les phages avec leurs têtes cubiques à symétrie icosaédrique, leurs longues queues et surtout leurs six fibres terminales en forme de « pattes d'insectes », ressemblent tous au L.E.M. (module lunaire) des missions Apollo (**figure 1**). Or, la diversité morphologique des phages est bien plus importante (**figure 2**) [3, 4].

Ce phylum de virus étant quantitativement le plus important, les variations morphologiques sont bien plus nombreuses que les organisations décrites en virologie humaine, dans lesquelles on ne retrouve que trois structures à symétrie variable: icosaédrique, hélicoïdale, et symétrie complexe. Les variations de forme, de taille, de symétrie dans la morphologie des phages permettent de classer les bactériophages en sept groupes différents, eux-mêmes scindés en vingt et un sous-groupes, parfois composés d'éléments très polymorphes.

Historiquement, les premières descriptions précises de phages n'ont été permises qu'au début de la seconde guerre mondiale, avec l'avènement de la microscopie électronique. Ainsi entre 1943 et 1965, plus de 11000 publications ont décrit de nouvelles espèces ou de nouvelles propriétés de phages. Cependant, le manque de standardisation, dans les critères à prendre en compte dans la description des phages, fit que nombre de phages étudiés avaient souvent été préalablement décrits. Il fallut attendre 1967 et les travaux de Bradley pour voir se dessiner une première classification consensuelle. En 1967, 111 phages différents ont été décrits depuis les débuts de la microscopie électronique. Bradley les divisa en six grands morphotypes selon l'aspect de leurs capsides et la nature biochimique de leurs génomes. Il les classa de A à F [5]

Les phages du groupe A ont une architecture typique associant une tête cubique à symétrie icosaédrique isométrique, prolongée d'un cou, puis d'une queue protéique de symétrie hélicoïdale. Cette dernière est constituée de deux parties. L'une, externe, lui confère son aspect strié et métamérisé. Elle correspond à un ruban protéique dont les éléments peuvent glisser les uns sur les autres dans certaines conditions, attribuant des propriétés contractiles à cette partie de la queue. L'autre partie, interne, se compose de

Figure 1 : Structure schématique d'un phage caudé [6]

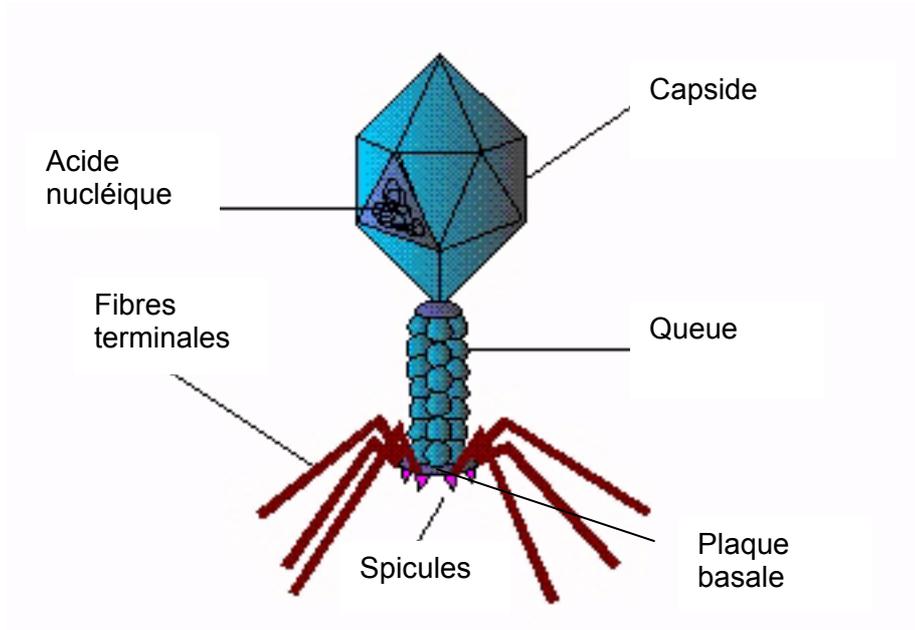
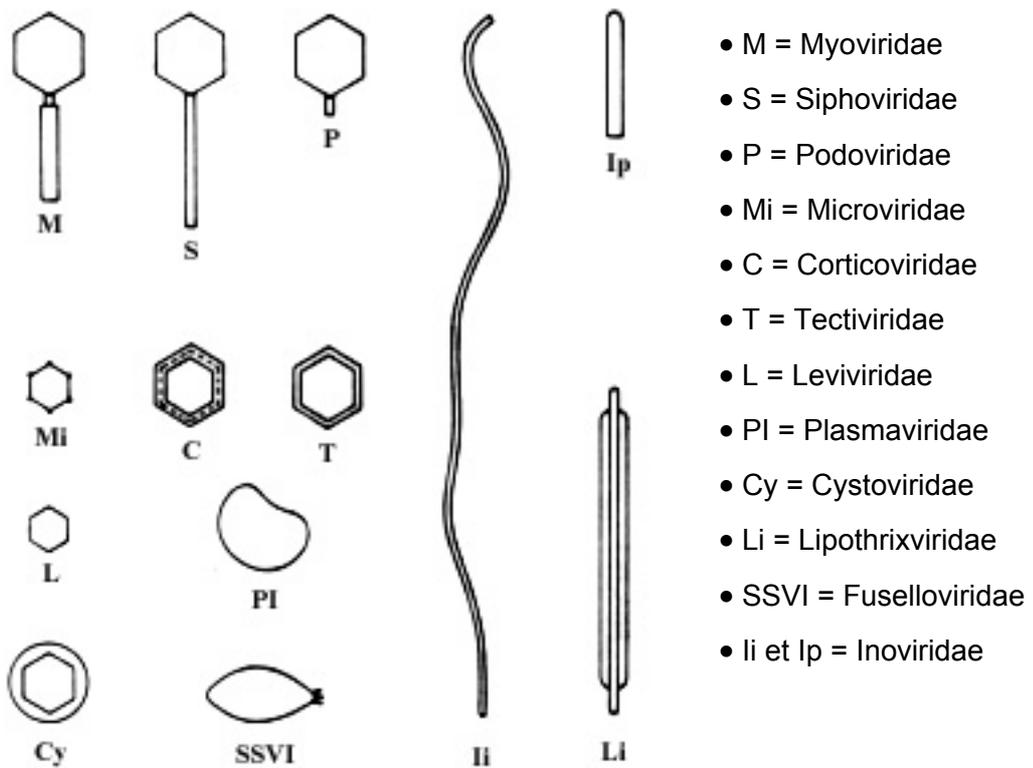


Figure 2 : Diversité morphologique des phages. D'après Ackermann [4]



filaments protéiques rigides, non-contractiles, agencés en un tube dont l'axe est parallèle à celui de la queue. A l'extrémité de cette dernière s'implantent six spicules et six fibres en « patte d'insectes » dont le rôle est primordial dans la reconnaissance des récepteurs à la surface de la cible bactérienne.

Les phages du groupe B, le plus important quantitativement, rassemblent aussi des phages caudés. Leur queue striée hélicoïdale n'est pas contractile, mais elle est aussi dotée à son extrémité distale, de fibres terminales et subterminales plus courtes que celles des phages du groupe A, et en nombre variable selon les espèces.

Les phages du groupe C, dernier groupe de phages caudés, sont dotés d'une queue plus courte (17 nm contre 65 à 570 nm pour les virus du groupe B) et non-contractile. Ces morphotypes caudés n'ont longtemps été observés et décrits que chez les virus de bactérie. C'est sûrement une des raisons pour lesquelles ils sont systématiquement associés à l'archétype du phage. Mais récemment, ont été découverts des virus très proches morphologiquement, capables d'infecter des champignons et des algues microscopiques.

Les phages des groupes D et E ressemblent beaucoup plus à certains virus humains. Ils sont cubiques, à symétrie icosaédrique isométrique, structure géométrique agencée de facettes en forme de triangles équilatéraux, comportant 12 sommets, 20 faces et 30 arêtes. Ils se distinguent l'un de l'autre par la nature de leur génome. Les virus du groupe D sont à ADN et les virus du groupe E à ARN.

Enfin Bradley décrivait **le groupe F**, composé alors d'un seul élément. Ces phages ont une forme très particulière de long filament flexible (phages filamenteux) de 760 à 1950 nm de long sur 6 à 8 nm de diamètre correspondant à une structure à symétrie hélicoïdale en forme de long bâtonnet.[4, 5] (**figure 2**)

Cette première classification fit l'unanimité chez les virologistes lorsqu'elle fut proposée pour la première fois. Elle fut la base de toutes les classifications qui suivirent. Ackermann la modifia et la compléta en 1974 [7].

À cette époque 1151 phages étaient répertoriés. Il divisa les groupes A, B et C en trois sous-groupes, numérotés de 1 à 3 selon le rapport entre la hauteur et la largeur de la tête du phage. Le groupe D fut divisé en quatre sous-groupes (D1 à D4), dans lesquels on observe un gradient de complexité dans l'architecture de la capsid. Les capsomères peuvent s'organiser en une structure simple cubique à symétrie icosaédrique comme dans le sous-groupe D2, mais ce morphotype très rare a été peu observé.

Les phages du sous-groupe D1 ont aussi une organisation cubique à symétrie icosaédrique mais les capsomères situés au niveau des sommets des facettes triangulaires constituant la base de la structure, ont une forme en bouton (angl: knobs) donnant un relief spiculé au virion.

Les deux derniers sous-groupes D3 et D4 ont, malgré leur aspect extérieur, des capsides plus élaborées. Les bactériophages du groupe D4 se caractérisent par une capside à symétrie cubique formée de deux couches: une couche protéique externe fine et rigide et une couche lipoprotéique interne plus épaisse et flexible. Ceux du sous-groupe D3 ont aussi une capside en bicouche, mais les deux feuillettes (protéique et lipoprotéique) sont séparés par une membrane lipidique qui a un rôle majeur dans l'attachement du virion à sa cible.

Dès lors, le groupe E se distingua du groupe D non plus seulement par la nature biochimique de son génome mais aussi par la simplicité de l'agencement de ses capsides (cubiques icosaédriques). Il fut seulement divisé en sous-groupes 1 et 2 en fonction de la présence ou non d'une enveloppe. Les virus du groupe E2 sont enveloppés.

Un nouveau type de phage filamenteux observé depuis 1967 constitua le groupe F2. Plus court que son parent F1 avec une longueur de 85 à 250 nm pour un diamètre de 10 à 16 nm, il est caractérisé par une structure hélicoïdale et a un aspect en balle de revolver.

Enfin, fut créé le groupe G ou groupe des phages pléomorphiques. Ce dernier groupe est composé de phages très hétérogènes. Très proches sur le plan morphologique des virus de l'hépatite delta, ils ont une particule virale uniquement limitée par une enveloppe lipidique.

Ackermann fut le conservateur d'une des plus grandes collections de bactériophages du Monde, rassemblée au sein du Centre de Référence des Virus de Bactéries de la Faculté de Médecine de l'Université de Laval à Québec (Canada). Elle lui permit de mettre à jour très régulièrement cette classification en y intégrant les nouveaux morphotypes que lui ou d'autres spécialistes internationaux décrivent. La dernière d'entre elles établie en 2001 [4, 8, 9], permit de classer plus de 5000 phages décrits et recensés depuis les années quarante. Elle se divise toujours en sept groupes majeurs et en vingt et un sous-groupes. Toujours selon le même principe qu'en 1974, elle se compose des immuables groupes A, B, C, D et E et de leurs sous-groupes. Seuls les groupes F et G ont été enrichis au fil des années de nouveaux sous-groupes.

Ainsi, ont été distingués au sein des phages filamenteux, les sous-groupes F3 et F4 dont les virus ont, comme ceux composant F2, une structure à symétrie hélicoïdale.

Les virus du groupe F3 ont une taille de 400 nm de long sur 40 nm de diamètre. Ils sont enveloppés, mais cette enveloppe lipidique est perméable aux capsomères au niveau des

extrémités. C'est dans cette région que se concentrent les capsomères impliqués dans l'adsorption. Leur paroi a un aspect rugueux lié à des déformations de l'enveloppe provoquées par les projections de capsomères sous-jacents.

Le groupe F4 est non enveloppé. Sa morphologie est extrêmement proche de celle de l'agent infectieux responsable de la mosaïque du tabac. Mais il possède à l'une de ses extrémités trois excroissances protéiques qui sont les structures impliquées dans la fixation à la surface de l'hôte.

Enfin le groupe G2 est composé de virus non encapsidés. Pléomorphes, ces derniers ont néanmoins le plus souvent une forme ovoïde due à la présence de protéines polaires soit en forme en citron (citrophages : à 2 protéines bipolaires) ou en larme, (dacryophages : à protéine unipolaire).

Pour les mêmes raisons que celles qui limitent les connaissances moléculaires, la nature biochimique exacte des protéines et des lipides entrant dans la composition des diverses parois du virion, a été relativement peu étudiée et n'est bien connue que pour de rares espèces.

Depuis 1970, parallèlement à ces travaux, le Comité International de Taxonomie Virale (International Committee on Taxonomy of Virus: ICTV) tente d'établir une liste taxonomique des phages. Comme les six précédentes, sa dernière classification distingue, selon des critères (morphologie, structure de la capside, nature du génome) identiques à ceux Bradley et Ackermann, les différentes familles de phages.

2.2 TAXONOMIE

2.2.1 Histoire de la taxonomie phagique

En 1918, soit un an après leur découverte le seul phage isolé jusqu'alors fut nommé « *Bacteriophagum intestinalis* » [10]. Félix D'Herelle à qui l'on doit cette nomination avait déduit de ses travaux qu'il n'existait qu'un seul phage dont le spectre d'activité s'étend sur plusieurs espèces de bactéries. Bien que ses premières hypothèses quant à la nature des phénomènes qu'il décrivit en 1917 se soient par la suite avérées parfaitement justes, cette déduction était fautive. D'Herelle travaillait avec des suspensions de phages polyvalentes obtenues à partir de fécès de patients malades ou convalescents, qu'il testait sur des cultures bactériennes en milieu liquide. Il cultivait donc des espèces de phages différents sans s'en rendre compte. Ce type d'erreur expérimentale émailla les premiers travaux (y compris cliniques) sur les phages et explique les nombreuses polémiques, parfois virulentes, sur la nature du phénomène lytique observé par Twort dès 1915, ainsi que sur l'efficacité thérapeutique réelle des phages.

En 1932, l'amélioration des procédés d'ultrafiltration permit de distinguer des variations de taille du « phage de D'Herelle ». En outre, en 1933, les développements récents de l'immunologie permirent de mettre en évidence l'existence des variations antigéniques du phage. Il paraissait dès lors, de plus en plus évident, qu'il n'y avait pas un phage unique mais plusieurs types de phages. Les premières tentatives de classifications taxonomiques ou du moins de nomination des variants de Bacteriophagum commençaient.

De nombreux critères discriminants étaient désormais à la disposition des scientifiques. La taille, les capacités de résistance aux contraintes du milieu extérieur (chaleur, détergents, pH), les cibles bactériennes et d'autres propriétés permettaient de différencier les phages les uns des autres. Mais en l'absence de consensus, chacun établissait sa propre classification, en ne prenant en compte que certains critères ou en leur attribuant, plus ou moins arbitrairement, une échelle de valeur.

Il est important de rappeler à ce stade que la définition du virion ne sera proposée par Horne qu'en 1953. Durant toute la période de 1917 à 1939, les virus étaient définis comme étant des agents infectieux filtrants non observables. Les scientifiques n'avaient qu'une très vague idée de la morphologie des agents infectieux qu'ils manipulaient. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les arrivées successives de la microscopie électronique puis de la coloration négative, allaient révolutionner les connaissances sur les virus et sur leur classification.

Une première tentative de classification standardisée des virus sera avancée en 1962 par Lwoff, Horne et Tournier (le système L.H.T.) [11]. Mais le manque de critères pris en compte, la complexité de la nomination sous forme d'un cryptogramme rendaient le procédé difficile à l'utilisation et fort incomplet (par exemple: les critères choisis ne permettaient pas de distinguer les différentes formes de phages caudés). De nombreux virologistes s'opposèrent donc à sa diffusion.

La classification initiée par Bradley constitue la base de la taxonomie moderne des phages. Les groupes et sous-groupes que ce dernier puis Ackermann ont parfaitement décrits ont été dénommés par le Comité International de Taxonomie Virale (ICTV) à partir du début des années soixante-dix.

2.2.2 Taxonomie contemporaine

Actuellement, la septième édition de taxonomie virale proposée par l'ICTV distingue un ordre, treize familles et trente genres permettant de classer plus de 5000 espèces différentes de bactériophages. Les familles se calquent parfaitement sur les groupes morphologiques

qu'Ackermann décrivit en 2001 [4], [12]. Seul le groupe D2, rarissime, n'a pas été repris dans cette nomenclature internationale.

2.2.2.1 Les familles

Les phages dimorphiques ou caudés forment le groupe le plus important quantitativement (95%). Ils constituent donc à eux seuls un ordre: les Caudovirales .

Les groupes A, B et C correspondent respectivement aux familles des Myoviridae (25%), Siphoviridae (61%) et Podoviridae (14%). On peut déjà noter que la nomination latine ou grecque des familles de phages se base sur les propriétés ou l'aspect de leurs capsides ou enveloppes. Ainsi le choix des noms de ces trois familles provient des propriétés de leurs queues. Les Myoviridae ont une longue queue contractile. Les Siphoviridae ont une queue creuse non contractile. Enfin les Podoviridae ont une queue courte non contractile évoquant plutôt un pseudopode.

Le groupe D (sauf D2) correspond aux Microviridae: les plus petits de la famille mais aussi des phages isolés, avec un diamètre maximal de 25 nm (D1); aux Corticoviridae qui avec leur 3 écorces ont un diamètre de 60 nm (D3) et aux Tectiviridae qui, recouverts par leur bicouche protéique, atteignent un diamètre de 63 nm (D4).

Le groupe E1, composé de virus dont l'architecture claire et simple fait 6 nm de diamètre se nomme Leviviridae et le groupe E2 enveloppé dans une « vessie » lipidique de 58 nm de diamètre, Cystoviridae.

La famille des Inoviridae est composée des groupes F1 et F2, correspondant aux deux genres de cette famille. Les Inovirus, correspondant au sous-groupe F1 à l'aspect si particulier de longue fibre musculaire. Tandis que le sous-groupe F2 composé de phages en petits bâtonnets est nommé Plectrovirus. Les Lipothrixviridae ne contiennent que le groupe F3. La plus récente des familles, apparue dans la septième version de la classification taxonomique internationale, correspond aux Rudiviridae (ou Tobacco Mosaic Virus like) ou groupe F4 d'Ackermann.

Enfin les groupes G1 et G2 ont été respectivement transformés en famille des Plasmaviridae et des Fuselloviridae (ovoïdes).

Comme nous le reverrons dans l'un des chapitres suivants, certaines de ces familles sont aussi caractérisées par la spécificité de leurs cibles: eubactéries, archéobactéries, mycoplasmes, spirochètes.

2.2.2.2 Les genres

Comme dans les autres ordres, les familles sont subdivisées en genres. Jusqu'au milieu des

années quatre-vingt-dix, certaines familles, souvent les plus grandes comme celles des phages caudés, n'avaient pas de genre associé. Les familles les moins denses avaient quant à elles, un seul genre dont le nom correspondait à celui de la famille, suivi du suffixe -virus à la place de -viridae; par exemple: famille: Corticoviridae et genre (unique): Corticovirus.

Depuis 1996, toutes les familles ont au moins un genre. Le nombre de genres par famille est variable selon la quantité des phages qui la composent. Ainsi les phages caudés, les plus nombreux, se répartissent au sein de 15 genres (Myoviridae: 6; Siphoviridae: 6 ; Podoviridae: 3) alors que sept familles ne comptent seulement qu'un genre.

Le nom de genre des familles de phages caudés est assez particulier par rapport aux nomenclatures d'inspiration grecque ou latine habituellement utilisées en biologie. En effet, leur nom correspond à l'espèce de phage la plus connue du genre sous le vocable: virus de type T4 (Genre de Myoviridae). Les noms de genre qui avaient déjà été attribués ont été conservés.

Dans sa dernière édition, la taxonomie de l'ICTV répertorie trente genres.

2.2.2.3 Les espèces

Le nom d'espèce de phages ne répond à aucune règle de nomenclature. Durant plus de 50 ans, les auteurs ont nommé les phages selon leur imagination et humeur du moment. Certains sont identifiés par un code mélangeant des lettres grecques ou latines associées parfois au nom de la première cible sur laquelle ils ont été isolés, et/ou assortis d'un numéro (ex T4, T7, λ...). L'ensemble est assez barbare. Néanmoins, pour les phages les plus récemment décrits, l'ICTV tente d'imposer aux scientifiques un système nominal plus rigoureux éliminant les lettres de l'alphabet grecque et prenant en compte surtout l'hôte du phage.

Les taxonomistes sont conscients que beaucoup reste à faire et de subir le manque de rigueur et d'absence de consensus. Bien qu'ils essayent de mettre à jour le plus régulièrement possible leur nomenclature en classant les 150 phages découverts annuellement, ils négligent consciemment certains phages décrits et même propagés (cultivés). Ils ont préféré axer leur travail vers une traque des doublons et des « faux phages » et tentent d'imposer une standardisation de la dénomination des phages.

Actuellement, certains taxonomistes spécialisés dans l'étude du rapport entre les familles de phages et les genres ou espèces bactériens pensent que les bouleversements engendrés

par la phylogénétique dans les règles de la taxonomie bactérienne auront des conséquences importantes sur la taxonomie phagique [3].

2.3 HABITAT

2.3.1 Cibles bactériennes

Les phages constituent une superfamille de virus, la plus importante quantitativement. Ils ont pour cible plus de 140 genres bactériens [2, 8]. Longtemps, les spécialistes des phages ont pensé qu'un phage n'avait pour cible qu'une et une seule espèce bactérienne.

Mais le développement de la lysotypie, et la découverte quasi exponentielle de nouvelles espèces de phages, a mis en évidence qu'un phage pouvait avoir une spécificité large en infectant plusieurs espèces bactériennes d'un même genre. Ceci est lié à la nature physico-chimique du site d'adsorption des phages sur la paroi bactérienne. Un même récepteur peut être le composant de la surface de plusieurs hôtes différents. Il permet ainsi à un même phage d'être infectant pour plusieurs bactéries. Étonnement les phages décrits jusqu'alors gardent encore une grande spécificité d'espèce.

Inversement, une même bactérie peut être la cible de phages de différentes familles ou de différents genres, car une bactérie peut présenter à sa surface plusieurs récepteurs potentiels de différents phages. Ainsi dans le cas des staphylocoques, en 2000, plus d'une centaine de phages spécifiques étaient référencés. Tous appartiennent à l'ordre des Caudovirales [9].

Néanmoins, certaines familles de phages ont des mécanismes d'infestation impliquant des structures hautement spécifiques de l'hôte. Leur spectre d'activité reste extrêmement étroit et peut se limiter à une seule espèce bactérienne (par exemple: le Tectivirus Φ NS11 de *Bacillus acidocaldarius*). Réciproquement certaines « bactéries », comme les eubactéries ou archéobactéries, n'hébergent qu'une espèce de phage.

2.3.1.1 Les phages caudés

Les phages caudés, qui constituent le groupe morphologique le plus important puisqu'ils représentent 95% des phages isolés, identifiés et classés, ont pour cibles plus de 120 genres bactériens: cocci et bacilles, à Gram positif et négatif, aérobies et anaérobies, sporulées et non sporulées, des spirochètes, des bactéries intracellulaires y compris les mycobactéries. Les archéobactéries, ces formes ancestrales, frustes et défectives de bactéries qui ont été isolées dans des écosystèmes extrêmes ont aussi leurs phages [13, 14].

Parmi les trois familles de phages caudés, les Siphoviridae (groupe B) sont les plus nombreux, mais les bactéries à Gram négatif (entérobactéries) sont majoritairement la cible des Myoviridae (groupe A). Cette très forte proportion de phages caudés dans les classifications actuelles n'est peut-être pas le reflet de la réalité. En effet, ils parasitent des bactéries très étudiées dans de nombreuses branches de la biologie (médecines humaine et vétérinaire, agronomie, écologie,...), or ces bactéries cultivables ne représentent qu'une fraction du monde bactérien.

2.3.2.2 Les phages non caudés

Les phages non caudés, c'est-à-dire dix familles de phages, représentent 5% des phages connus actuellement. Leur spectre de colonisation bactérienne est beaucoup moins étendu. Seulement, une trentaine de genres bactériens sont colonisables, et plus d'un tiers d'entre eux appartiennent aux familles des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae*. C'est parmi ces familles qu'on trouve les phages les plus spécifiques d'une espèce bactérienne. Ainsi la famille cubique des Cystoviridae qui ne comprend qu'un seul genre et qu'une seule espèce

2.3.2 Niches écologiques et interactions phage-bactérie

La première évidence est que les phages ont le même habitat que leurs hôtes. Ainsi, on peut les retrouver dans l'eau, le sol, sur les plantes, les fluides corporels des êtres humains ou des animaux, sains ou malades, l'alimentation, ainsi que dans de nombreux autres environnements, parfois même les plus extrêmes, telles des sources d'eau chaude (Tectivirus Φ NS11 de *Bacillus acidocaldarius*, Φ YS40 de *Thermus thermophilus*), les sédiments océaniques, les saumures, etc... [8, 14-16].

Les phages sont omniprésents. Les milieux les plus riches actuellement connus sont aquatiques : les eaux usagées d'égouts et les limons des fleuves et rivières contiennent les plus grandes densités de phages mesurées [15]. Dans la biosphère, les phages subsistent sous forme intra-bactérienne (on parle alors de provirus) ou sous formes libres. Cela implique que les structures qui les composent soient capables de résister aux conditions du milieu environnant. Selon les contraintes imposées par le milieu, les formes tempérées ou libres dominent la population.

Il peut exister des variantes dans cette symbiose « bactérie bactériophage », ainsi les spores de bactéries anaérobies peuvent contenir des inclusions renfermant des phages *ad integrum* en latence.

Les bactériophages peuvent être isolés de toutes ces niches écologiques selon des techniques anciennes regroupées sous le terme de propagation [17]. Souvent oubliées, ces techniques sont d'une grande simplicité. Leur principe repose sur une mise en contact du milieu duquel on veut isoler les phages (eaux usagées ou limons de rivière), préalablement

décontaminé en bactéries (par chloroformation et centrifugation), et leur cible bactérienne dans un milieu de culture approprié aux exigences de cette dernière.

On peut aussi observer les milieux, après concentration, en microscopie électronique après coloration négative au phosphotungstate de potassium. L'inconvénient de cette seconde technique est qu'elle n'autorise pas la culture des phages et ne permet pas de connaître leurs cibles. En revanche, elle a un rendement très supérieur dans la découverte de nouveaux morphotypes.

Certains auteurs ont évalué les concentrations en phages dans différents milieux naturels. Même si les variations de densité sont extrêmement variables d'une niche à l'autre. Elles sont si importantes que tous arrivent à la même conclusion: les phages sont les microorganismes les plus nombreux sur Terre. Leur nombre total est généralement estimé à 10^{30} - 10^{32} .

Dans tous les pays, des phages ont été observés, isolés et propagés. Les travaux les plus récents sont le fruit des recherches de petites équipes très éclectiques: vétérinaires, agronomes, médecins, hygiénistes, biologistes marins.

Cette connaissance et compréhension du monde phagique a des retombées sur celle de l'évolution du monde bactérien. La très importante symbiose entre phage et bactérie dans certains milieux écologiques explique en partie comment des bactéries arrivent à survivre dans des conditions physico-chimiques extrêmes. Cette interaction qui implique l'environnement est à la base de théorie novatrice sur le contrôle naturel des populations dans certains microcosmes. Les auteurs qui développent cette théorie y voient une des rares formes naturelles d'équilibre et n'hésitent pas à employer le terme de co-évolution [14, 18].

2.4 CYCLES PHAGIQUES

Les phages ont absolument besoin de leur hôte pour perpétuer leur descendance. La bactérie fournit au phage parasite des éléments indispensables à la réalisation de son cycle. Ces cycles vitaux peuvent présenter des aspects très différents: lytique, lysogénique, pseudo-lysogénique ou chronique. **(figure 3)**

2.4.1 Le cycle lytique

Les nombreuses étapes du cycle des phages sont communes à celles des virus de cellules eucaryotes: la reconnaissance « cible-hôte », la séparation de l'acide nucléique de sa matrice protéique, l'expression et la réplication de l'acide nucléique, l'assemblage du virion, la libération puis la contamination **(figure 4)** [19, 20].

Cependant contrairement à un virus de cellule eucaryote qui n'a que la membrane cellulaire

à franchir, les phages vont être confrontés au peptidoglycane bactérien. Cette véritable muraille doit être traversée lors de l'infection bactérienne par le virus père mais aussi lors de la libération par les virus fils. Comme nous le montrerons dans les lignes qui suivent, l'évolution a doté les phages d'un matériel enzymatique élaboré et complexe qui permet à ces virus de parfaitement accomplir leur cycle.

La première phase est l'adsorption. Ce sont les structures impliquées tant à la surface des virus que des bactéries dans cette reconnaissance qui confèrent la très haute spécificité du couple « phages-cible bactérienne ». Les phages s'adsorbent en deux étapes. La première, réversible, implique un récepteur bactérien distal spécifique. La liaison entre le récepteur et le

Figure 3: Représentation schématique du cycle lytique et lysogénique [6]

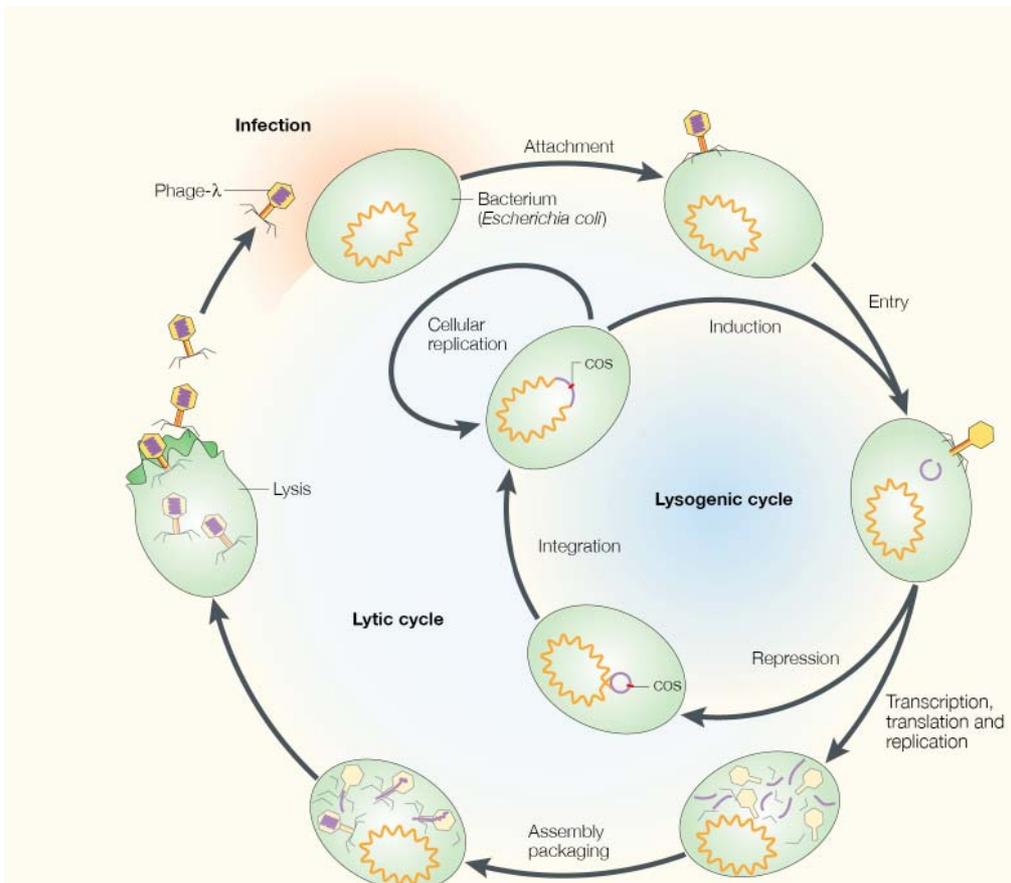
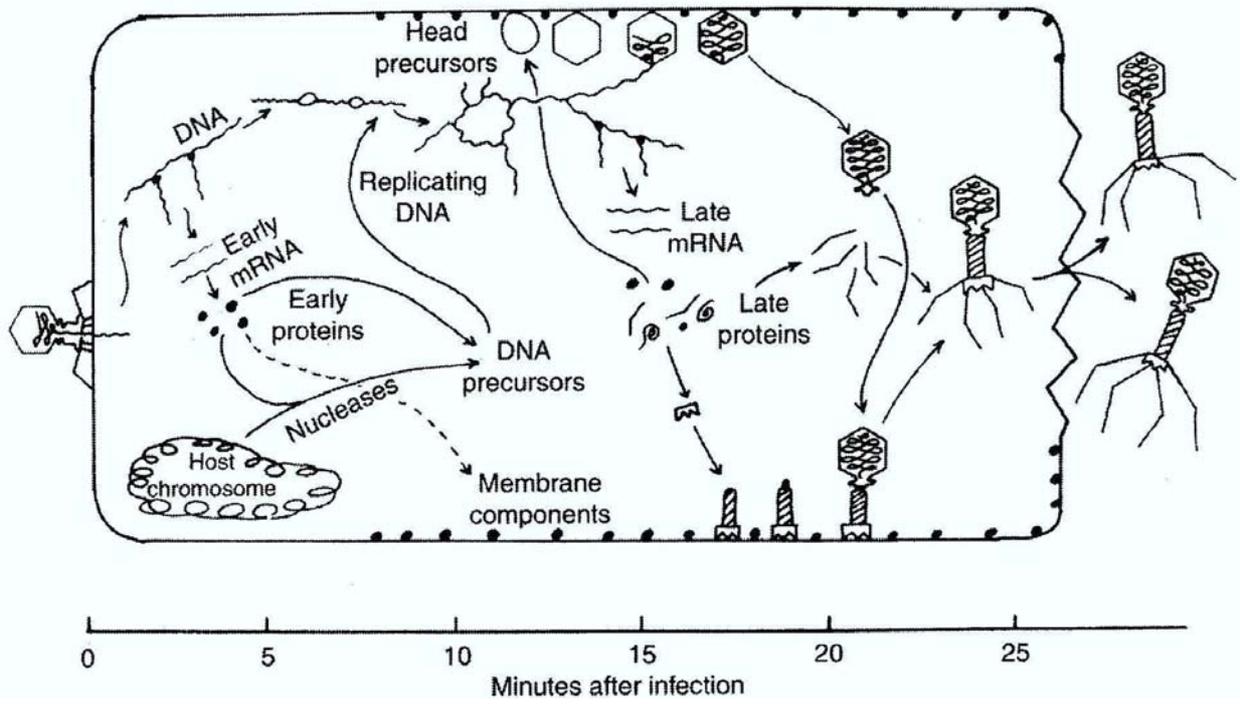


Figure 4: Le cycle lytique, exemple du phage λ [2]



phage, de type Van der Waals, est faible. À ce stade, le phage peut ne pas poursuivre l'infection de la bactérie. Si les conditions environnementales ou intrinsèques le permettent la seconde étape est initiée. Elle correspond à des modifications irréversibles de la structure tertiaire des protéines ou glycoprotéines impliquées qui fixent cette liaison de type « ligand-récepteur ». Dans le cas d'un cycle lytique, la cascade de réactions qui aboutit à la formation de nouveaux virus est alors irrémédiable. Parfois deux récepteurs sont impliqués dans l'adsorption. Le premier fixe le phage très en surface, par exemple une adhésine terminale d'un pili. Puis des changements conformationnels engendrés par cette liaison modifient l'organisation du support du récepteur qui va alors « tracter » le phage au contact d'un second récepteur plus proche de la membrane bactérienne.

Une fois l'adsorption terminée le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne débute immédiatement. Les phages disposent d'un équipement enzymatique et glycoprotéique, adjacent à leurs sites de fixation, capable de perforer la paroi des bactéries. Leur activation est systématiquement déclenchée par la cascade de modifications structurelles de la paroi du phage, provoquée par la deuxième étape de l'adsorption. Cette digestion du peptidoglycane se poursuit jusqu'à la membrane bactérienne qui sera perforée de la même manière [20].

L'acide nucléique du virus peut alors être transporté dans le cytoplasme bactérien tandis que la capsidite reste à l'extérieur. Ce processus est mal connu et semble beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. Le premier phénomène permettant cette entrée est la différence de pression entre l'intérieur de la capsidite (elle a été évaluée à 60 atmosphères) et celle du cytoplasme bactérien. Mais il semble insuffisant et doit être relayé par d'autres mécanismes. Les rares modèles de phages qui ont été étudiés montrent des stratégies très élaborées et très différentes les unes des autres. Quoiqu'il en soit, contrairement à une idée reçue souvent rapportée d'une publication à une autre, les phages n'injectent jamais (même si leur queue est contractile) leur acide nucléique dans la bactérie [20, 21].

Une fois internalisé, le matériel génétique est soit intégré dans le génome bactérien sous forme de « boucle » soit libre dans le cytoplasme. Quels que soient les phages, il existe donc une phase de vulnérabilité quand le génome phagique est dans l'hôte mais pas dans son génome. Car il est alors la cible potentielle d'endonucléases bactériennes. Là encore, les phages ont la parade puisque des enzymes inhibitrices de ces endonucléases sont introduites en même temps ou juste avant l'entrée du génome phagique [20, 21]. Ainsi protégé l'acide nucléique phagique peut commencer sa réplication.

Durant cette nouvelle étape, tout le métabolisme de la cible est détourné au bénéfice de la multiplication du phage. Certains phages poussent le parasitisme à son paroxysme en utilisant le propre génome de la bactérie comme source de nucléotides. La réplication et la transcription du génome sont contemporaines. La synthèse de nouvelles particules virales est donc extrêmement rapide. Pour les phages caudés, la morphogénèse est très similaire

d'une espèce à l'autre et respecte a priori toujours la même chronologie. Cette phase de métabolisme intense comprise entre l'adsorption et la libération de nouveaux virions est la phase dite d'éclipse. Les phages se répliquent avec une coordination optimale, chaque étape semblant suivre une partition bien établie qui s'achève par la production des virus fils [20].

Cette dernière, responsable de la mort de la bactérie, est la libération. Chez les phages de grande taille, la lyse de la paroi bactérienne permettant la libération des nouveaux virus dans le milieu extérieur résulte de la co-activité de deux enzymes lytiques dont les protéines sont codées par le génome phagique. Le premier est celui des holines (**figure 5**). Cette famille d'enzymes communes à tous les grands phages perce la membrane plasmique des bactéries. Elle s'y polymérise sous forme de pores. L'augmentation de perméabilité engendrée perturbe l'homéostasie de la bactérie mais insuffisamment pour la lyser. En revanche, la lumière de ces pores permet le passage d'un certain nombre de molécules parfois de grandes tailles, parmi lesquelles le second groupe d'enzymes lytiques. Ces hydrolases ou endolysines capables de dépolymériser le peptidoglycane sont responsables in fine de la mort bactérienne. Cette merveilleuse mécanique est réglée et fonctionne pour avoir un rendement maximum. En effet, les holines sont synthétisées dès les premiers instants de la traduction, mais elles ne sont actives au niveau de la membrane bactérienne que lorsqu'une concentration seuil en hydrolase est atteinte. Or, ce seuil correspond parfaitement à l'acmé de la synthèse en virus fils [19, 22-24].

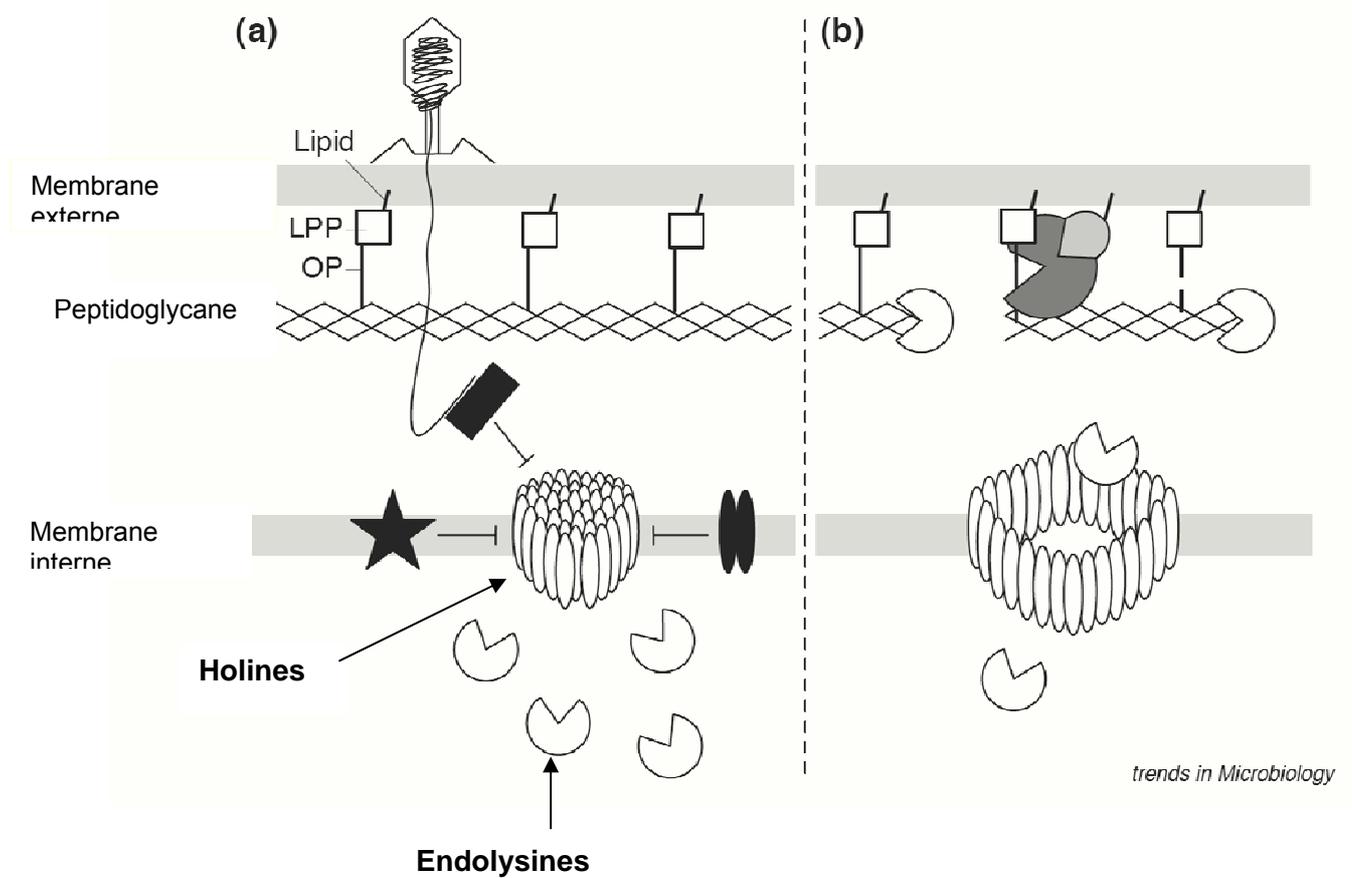
Chez les phages les plus petits, l'équipement se limite parfois à une seule enzyme. Certaines de ces enzymes ont un mode de fonctionnement qui n'est pas sans rappeler celui de la pénicilline. Elles ont en effet la capacité d'inhiber les ultimes étapes de la synthèse du peptidoglycane bactérien [22].

Toutes ces enzymes participent aussi à la spécificité bactérie-phage. Chacune d'elles n'est efficace que sur une cible bactérienne définie. Cette particularité est mise à contribution dans certaines applications pratiques des phages [23-25].

Comme dans le cas des virus de cellules eucaryotes, le cycle lytique phagique permet à partir d'un seul individu de produire plusieurs centaines de virus fils.

Pour que son activité soit optimale la bactérie cible doit être métaboliquement active, c'est-à-dire en phase de croissance. D'autres paramètres peuvent faire varier de manière considérable les interactions entre le phage et son hôte bactérien : température, conditions physico-chimiques (pH, oligoéléments, viscosité...) [14, 16, 26].

Figure 5: Représentation schématique du mécanisme de la lyse bactérienne par le couple holines-endolysines [19]



- « Single Step growth curve »

Le cycle infectieux phagique a été modélisé par Ellis et Delbrück en 1938. L'évolution de la concentration de phages dans les premières minutes qui suivent leur mise en contact avec une culture de bactéries cibles (sensibles à l'action du phage) en milieu liquide, est représenté sur la **figure 6**. La courbe A représente le nombre total de phages : les phages

ayant infecté une bactérie dans le mélange initial (centre infectieux), et les phages libres. L'adjonction de chloroforme au mélange initial dans les temps précoces, conduit à la destruction des bactéries et des phages déjà adsorbés ou en cours de formation dans les bactéries mais pas des phages libres dans le milieu ; Les centres infectieux ne sont donc plus pris en compte dans la mesure sur la courbe B. La phase de latence correspond à la période entre l'adsorption et la libération des phages néoformés par la lyse bactérienne. La phase d'éclipse, mise en évidence sur la courbe B, correspond à la période entre l'adsorption et la formation des nouveaux phages. Le *burst-size* est le nombre de phages obtenu pour un phage infectant initial. Tous les paramètres précédents sont variables en fonction du couple phage-bactérie étudié ainsi qu'en fonction des conditions environnementales.

UFP/cellule

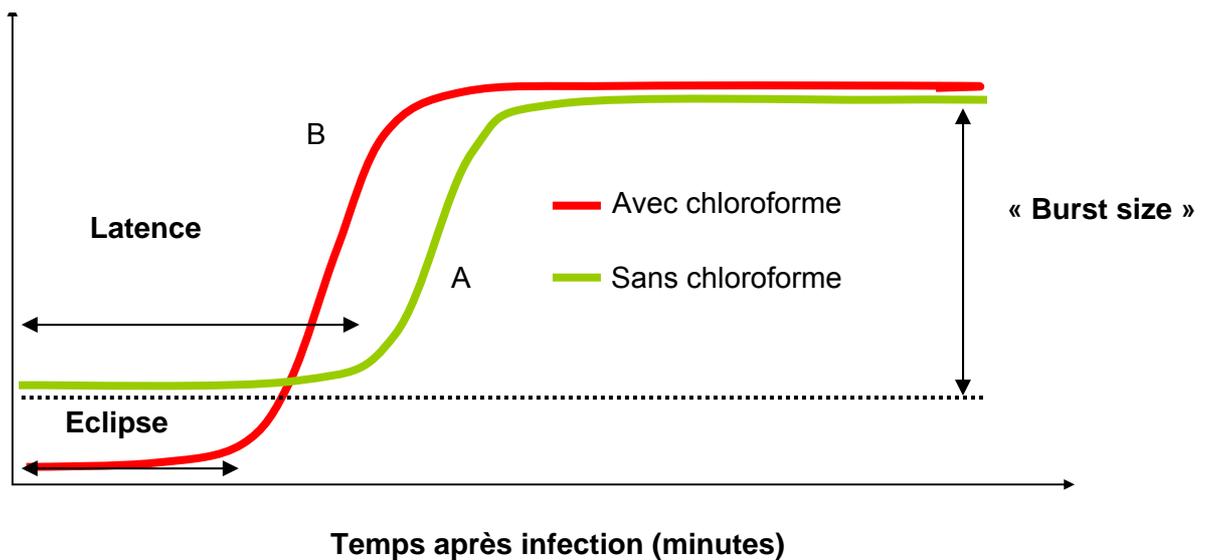


Figure 6 "Single step growth curve". D'après Ellis et Delbrück (15)

2.4.2 Les autres cycles

Dans le cycle lysogénique, le génome des phages appelés tempérés ou lysogéniques, par opposition aux phages lytiques évoqués précédemment, est intégré au génome bactérien sous forme de prophage [2, 6]. Silencieux, il reste latent. Il se réplique avec le génome bactérien et est ainsi transmis de générations en générations bactériennes jusqu'à l'induction éventuelle d'un cycle lytique. Cette induction peut être provoquée par de nombreux facteurs physico-chimiques: UV, variations de température ou de pH, agents cytotoxiques.

Le cycle pseudo lysogénique est un intermédiaire entre les deux premiers cycles décrits. Les phages ne se multiplient que dans une fraction de la population tandis que dans l'autre, ils sont latents. Il semblerait que ce phénomène soit dû à des mutations dans les gènes du prophage qui acquièrent alors la capacité à se multiplier de façon autonome.

Le cycle chronique n'existe que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre inovirus. En effet, dans leur cas, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse de façon chronique du génome phagique.

En thérapeutique, « seul » les phages lytiques ont un intérêt. Ce dernier est double. Le premier, évident, est la capacité lytique intrinsèque à l'ultime étape de leur cycle. Le second provient du fait que les phages sont le seul modèle d'agent thérapeutique dont les « concentrations » augmentent là où on a le plus besoin d'eux c'est-à-dire dans les sites infectés.

Quant aux autres phages, leurs indications *ad integrum* sont très limitées. Les phages tempérés sont même redoutés, car ils sont non seulement inactifs ou du moins ne produisent pas l'effet escompté mais surtout ils peuvent être les vecteurs de gènes capables de conférer à la bactérie hôte, de nouvelles propriétés pathogènes.

2.5 HISTOIRE DE LA PHAGOTHERAPIE

Longtemps, le débat fit rage pour savoir qui avait la primeur de la découverte des bactériophages. Aujourd'hui, il est communément admis qu'elle peut être attribuée à deux biologistes. En effet dans le contexte particulier de la Première Guerre Mondiale, ces deux scientifiques ont indépendamment et par hasard fait la même observation à deux ans d'intervalle.

Le premier est Frederick William Twort. En 1915, ce biologiste britannique remarqua par hasard que des colonies de microcoques qui contaminaient ses milieux de culture subissaient une transformation vitreuse. Étonné par ce phénomène, il tenta de repiquer en vain des colonies transparentes. Les bactéries de ces colonies étaient lysées. Il poursuivit quelques expériences et observa que ce phénomène lytique était transmissible et filtrable. Il émit plusieurs hypothèses quant à sa nature. Soit la lyse avait une origine exogène: une amibe ou une micro-bactérie filtrable et non visible en microscopie, un virus (dont les seules caractéristiques connues à l'époque étaient, leur filtrabilité, leur transmissibilité et leur non-visualisation en microscopie), une enzyme ou un protoplasme. Soit l'origine était endogène: une autolysine. Il fit des observations similaires sur des colonies de *Salmonella enterica*

« Typhi » isolées dans les selles d'enfants et de chiots. Faute de crédit en cette période de restriction, il fut contraint de stopper ses travaux [27].

L'autre découvreur était Félix Hubert D'Herelle, biologiste autodidacte et globe trotter d'origine Franco-canadienne. Il publia, en 1917, une observation très comparable à celle de Twort faite lors de travaux sur *Shigella dysenteriae* à l'Institut Pasteur de Paris [28].

Au début du siècle, D'Herelle qui travaillait en Amérique du Sud, eu l'idée d'utiliser une arme biologique dans la lutte contre les invasions de sauterelles. Il avait remarqué que certaines populations de sauterelles étaient atteintes d'une diarrhée contagieuse et létale. Il isola, dans les déjections d'insectes malades, l'agent microbien responsable: un coccobacille. Puis il contamina quelques individus qu'il libéra dans les populations de sauterelles lors d'invasions. La technique fut radicale: les hordes d'insectes furent décimées. En 1915, il fut appelé en Afrique du Nord où les invasions de sauterelles étaient responsables de dégâts considérables dans les régions agricoles. Il isola de nouveau selon une technique identique, l'agent bactérien responsable. Mais il remarqua au sein de ces cultures de coccobacilles, la présence de « plages claires » à l'emporte-pièce. Intrigué, il fit part de ses observations à Charles Nicole (directeur de l'Institut Pasteur de Tunis) qui lui suggéra qu'il s'agissait d'un virus, peut être un co-agent voire le véritable responsable de la diarrhée. De retour en métropole à l'Institut Pasteur de Paris, il tenta de mettre en évidence le même phénomène sur d'autres bactéries notamment celles pathogènes pour l'homme. Ainsi, c'est lors de l'isolement de shigelles dans des selles de patients atteints de dysenterie bacillaire qu'il remarqua que celles de ceux qui allaient guérir et celles de convalescents contenaient un « principe antagoniste ». Cet agent était capable d'une part, d'inhiber toute croissance bactérienne en milieu liquide et d'autre part, de donner des plages de lyse sur les cultures en gélose solide. Il démontra que ce principe lytique était filtrable, non visible en microscopie, cultivable et transmissible à l'infini de culture de shigelles en culture de shigelles. Pour lui, conformément aux traditions « lamarckiennes » qui imprégnaient la biologie ce début de XX siècle, ces caractéristiques ne pouvaient être attribuées qu'à un agent microbien, unique membre d'une nouvelle espèce. Il le nomma *Bacteriophagum intestinalis* [10].

Appliquant un des préceptes de l'école pasteurienne sur les propriétés de modifications des microbes, il affirma que ce microbe avait la capacité de s'adapter à toute cible bactérienne et d'accroître sa spécificité. Un même filtrat de selles de dysentérique pouvait détruire des espèces de bactéries autres que les shigelles. Le pouvoir lytique de ce filtrat s'accroissait après plusieurs passages. De plus, le fait qu'il fût présent dans les selles de patients convalescents, et absent de celles de patients en phase d'état ou dans les nécropsies de patients décédés, témoignait de son rôle majeur dans le « phénomène de guérison » [29].

Dès cette première série de travaux, D'Herelle envisagea l'utilisation des phages en

thérapeutique. Sur son premier modèle animal, il mit en évidence l'effet protecteur des phages sur un animal infecté par une shigelle et l'absence d'effets secondaires liés à cette ingestion sur l'animal sain.

Jusqu'à sa mort en 1949, il travailla à démontrer et à faire admettre à la communauté scientifique toutes ses hypothèses. Bien qu'il en fût le plus grand défenseur, sa personnalité et son comportement autocratique ainsi que ses choix « politiques » auront paradoxalement une influence très négative sur le développement de la phagothérapie en Occident.

2.5.1 1917-1941: Grandeur et décadence

Durant une vingtaine d'années, la phagothérapie connut, malgré de nombreux écueils, une expansion phénoménale. Dès sa première publication, D'Herelle fut attaqué par une partie de la communauté scientifique internationale à propos de la nature exacte du phénomène qu'il avait observé. Quatre grandes théories s'opposèrent à la sienne[30, 31].

La première fut défendue par le Pasteurien belge et futur « Nobélisé » (en 1919) Jules Bordet. Celui qui devint le plus combatif ennemi de D'Herelle, attribuait la lyse à un principe inerte porté par l'hérédité bactérienne capable d'agir sur la physiologie des bactéries sensibles en provoquant leur autolyse. Pour appuyer leur thèse sur la production spontanée de phages, Bordet et Ciuca injectèrent par voie intra-péritonéale des cultures de colibacilles, sans phage a priori, à des cobayes. Après 24 heures d'incubation, ils ponctionnèrent le liquide péritonéal et mirent en évidence dans les exsudats, un principe lytique capable d'inhiber les cultures de colibacilles *in vitro*. Les deux collaborateurs interprétèrent cette lyse spontanée comme une capacité intrinsèque de certaines bactéries à s'autolyser. Ils utilisèrent pour la première fois le terme de « lysogénie » [32]. En fait, dans cette série d'expériences, Bordet et Ciuca travaillaient probablement sur des souches d'*Escherichia coli* contaminées par un prophage. Ces derniers ont la capacité de sortir de leur latence sous l'influence de stimuli physico-chimiques exogènes, ce qui fut certainement le cas durant ces manipulations. Cette propriété de lysogénisation des phages ne fut comprise qu'en 1950, et resta jusqu'aux années quarante, un des principaux arguments des opposants à la théorie sur la nature virale du phage.

Deux des autres théories adhéraient aussi à l'idée que le phage était une substance inerte. Dans un ouvrage de 1928, le biologiste américain Bronfenbrenner, fervent opposant de la phagothérapie [33-37] analysa les nombreux travaux et arguments, démontrant que le phénomène lytique ne pouvait être dû qu'à une enzyme (diastase) ou un activateur enzymatique endobactérien, capable de provoquer l'autolyse bactérienne, et qui une fois libéré dans le milieu extérieur, avait la capacité de lyser les bactéries sensibles [31]. Pour Kabeshima, le principe lytique était une réaction en cascade: les cellules de l'organisme malade libérant un (pro)ferment. Ce dernier induisant la production d'une enzyme

endobactérienne, qui libérée dans la bactérie, provoque sa lyse [38]. Cette théorie était aussi admise par Bordet

Ces trois interprétations très similaires du phénomène phagique, étaient, compte tenu des connaissances scientifiques et des outils disponibles en ce début de XXIème siècle, parfaitement légitimes et tout à fait opposables à celle de D'Herelle. Les différents protagonistes mirent tout en oeuvre pour confirmer leurs hypothèses, en publiant leurs propres travaux et en critiquant les conclusions des travaux de leurs concurrents. À la fin des années trente, la quasi-totalité des spécialistes, sauf D'Herelle, se rallièrent pourtant à la conclusion que les phages étaient des protéines de grande masse moléculaire capables d'induire la lyse de bactéries cibles.

Pour D'Herelle, peu importaient ces joutes scientifiques par publications interposées. Sûr et certain de ses conclusions, il poursuivit ses travaux dans plusieurs directions. Ces investigations portèrent aussi bien sur l'amélioration des connaissances fondamentales que sur l'exploitation thérapeutique des propriétés bactériolytiques du phage.

En 1919, il eut pour la première fois, l'opportunité d'utiliser *Bacteriophagum intestinalis* comme agent antibactérien *in vivo* sur l'animal. Une épidémie de typhose aviaire (due à *Salmonella enterica* « Gallinarum ») décimait les poulaillers européens. Plusieurs départements français furent touchés. D'Herelle se rendit dans vingt-cinq élevages contaminés situés dans différents départements éloignés les uns des autres. Il injecta aux animaux malades et fit ingérer aux animaux sains, une suspension de phages élaborée à partir d'extrait de déjections de volatiles malades selon la même technique qui lui permit de faire sa découverte. Les résultats furent spectaculaires. 95% des volailles survécurent alors que cette infection était létale chez 95 à 100% des poules contaminées et non traitées. Il conclut que l'usage des phages était aussi actif en thérapeutique qu'en prophylaxie: la phagothérapie était née [39]. On retrouva D'Herelle quelques mois plus tard (1919-1920) en Cochinchine, à Saigon, où il traita selon la même technique et avec la même fortune, des buffles atteints de barbone (septicémie hémorragique bovine, constamment létale, due à *Pasteurella multocida*) [40]. Dans le cas de cette deuxième expérience, les résultats observés et les conclusions qui furent faites sont rétrospectivement très critiquables. Il est probable que D'Herelle a immunisé les bovins (en partie grâce aux débris bactériens souillant ses suspensions) plutôt que les avoir réellement traité par phagothérapie. De retour en France, il confirma ses espoirs sur un modèle animal de dysenterie du lapin qu'il traita avec toujours autant de réussite [39].

Fort de ses succès sur l'animal et bien loin de la loi Huriet qui légifère la recherche clinique d'aujourd'hui, D'Herelle allait très rapidement passer de l'animal à l'homme en utilisant la phagothérapie dans le traitement d'infection humaine. Il prit néanmoins soin de s'assurer

auparavant de l'absence d'effet secondaire sur des sujets selon une technique très personnelle. Portant l'altruiste à son paroxysme, il ingéra puis s'injecta une suspension de phages anti-shigelles, cette étude fut étendue aux membres de sa famille et à son équipe de recherche [39]. En l'absence (très subjective) d'effets notables, il n'y avait selon lui plus aucun obstacle à tester la phagothérapie sur l'Homme.

Deux faits majeurs aidèrent D'Herelle à obtenir le soutien d'une communauté médicale encore imprégnée de l'esprit de Claude Bernard et peu encline aux considérations bioéthiques, dans le franchissement de ce premier pas: la grande fréquence des épidémies dans cette période d'après-guerre et surtout l'absence de traitement antibactérien efficace à la disposition des thérapeutes.

Ainsi en 1921, il fit ingérer à quatre enfants, hospitalisés à l'Hôpital Necker (Paris) pour dysenterie bacillaire, quelques centimètres cubes d'une suspension de phages extrêmement actifs *in vitro* sur la souche incriminée. Les thérapeutes « complices » notèrent une régression très rapide des signes cliniques : « les selles n'étaient plus sanglantes et diminuaient en fréquence dans un délais de 6 à 24 heures après l'ingestion de la suspension phagique... ». L'un des enfants atteint d'une forme sévère dont l'issue paraissait fatale, fut sauvé. D'Herelle venait de réussir son pari [39]. Certitude confirmée par l'enthousiasme de la communauté médicale qui, au vu de ses résultats, allait multiplier les travaux sur les pathologies humaines et les épizooties.

La renommée des phages et de D'Herelle devint internationale. Il se déplaça partout où l'on fit appel à son savoir pour traiter de nouvelles pathologies ou aider les thérapeutes qui échouaient dans leurs tentatives de traitement par phagothérapie. En 1923, le Brésilien Da Costa Cruz en appliquant scrupuleusement les recommandations de D'Herelle obtint les mêmes résultats que lui dans le traitement de la dysenterie bacillaire, alors qu'il avait échoué quelques mois auparavant [39].

En 1926, il obtint à nouveau de bons résultats en traitant, par injections intra-ganglionnaires, des patients atteints de peste bubonique placés en quarantaine sur une île au large du canal de Suez [40, 41]. Puis en 1927, il se rendit aux Indes à la demande du gouvernement britannique afin de tenter d'éradiquer les épidémies de choléra qui ravageaient les populations autochtones. Lors d'une de ses premières expériences sur place, il traita tous les patients malades d'un village, et prit pour groupe témoin les patients du village voisin. Afin de ne pas biaiser son étude, il choisit des villages éloignés de toute structure médicale et dont les populations étaient sédentarisées. Les résultats furent édifiants: 8% de décès dans le village traité contre 62% dans le village non traité [42]. Il quitta les Indes et confia la poursuite des travaux à l'un de ses élèves: le colonel Morrisson. Ce dernier publia, en 1932, une des plus grosses études sur les bénéfices de la phagothérapie dans le traitement étiologique et prophylactique du choléra [43].

Quelle réussite extraordinaire pour cet étrange personnage qui falsifia probablement tout son

passé jusqu'à ses origines! Il se disait canadien, mais il est plus probable qu'il soit né en France. Il se pourrait même que D'Herelle soit un nom d'emprunt. Quant à sa formation scientifique, ses différents biographes ne retrouvent trace de son passage dans aucune Université. Il semblerait qu'il se soit autoproclamé scientifique et que grâce à un bon sens naturel et une forte personnalité, il ait réussi à duper ses contemporains [44]. Emprunt d'un orgueil démesuré et d'un besoin immense de la reconnaissance de ses pairs, D'Herelle sut parfois se rendre exaspérant. Ainsi pendant dix ans, il s'opposa vigoureusement et parfois avec malhonnêteté au biologiste belge André Gratia (élève de Jules Bordet). Ce dernier démontra clairement que le phénomène observé par Twort était identique au sien [45]. Il dû multiplier les expériences pour tenter de convaincre D'Herelle, plus têtu que jamais. Et il fallut attendre 1932 et l'arbitrage (à la demande de D'Herelle) de deux biologistes désignés, l'un par Gratia (Ernest Renaux) l'autre par D'Herelle (Paul Flu), pour que ce dernier acceptât enfin cette idée [31].

Mais il savait aussi enthousiasmer et put rassembler de nombreux disciples de la phagothérapie. Partout des médecins le plus souvent acquis à la cause de D'Herelle, mais aussi parfois sceptiques, conduirent leurs propres essais sur l'homme. Ainsi en 1928, le nombre de travaux publiés dépassait la centaine. Même si la plupart n'étaient que des cas cliniques, ils témoignaient de l'intérêt et surtout de l'espoir qu'apportait la phagothérapie. Dans le monde entier, et pour de nombreuses pathologies, les phages continuèrent à être mis à contribution [31, 46, 47].

- En médecine : à des fins thérapeutiques dans les infections cutanées aiguës ou chroniques à staphylocoque, du furoncle à la cellulite, des infections urinaires hautes et basses, des entéropathies bactériennes (colibacillose, typhoïde, dysenterie, choléra), de la peste ou à des fins prophylactiques (choléra).

- En chirurgie : en prophylaxie ou dans le traitement des infections du site opératoire, ou comme traitement adjuvant per-opératoire ou post-opératoire de la chirurgie septique.

Tous les voies d'administration furent utilisés : locales (topique, endovésicale, intra-rectale,...) et générales (orale, parentérale: intraveineuse, sous-cutanée, intra-péritonéale).

Les résultats furent très variables voire contradictoires: de l'échec complet à la thérapie miracle, en passant par des phénomènes de rémission avant récurrence et parfois décès [46-51]. Ce à quoi D'Herelle avec fatalisme répondait que la phagothérapie était « la thérapie du tout ou rien ».

Mais, à la charge ou à la décharge de la phagothérapie, les protocoles de soin, tant dans l'élaboration et le contrôle de la qualité des suspensions utilisées (activité *in vitro*, pureté, spécificité...), que dans les posologies, les fréquences et le mode d'administration des traitements, n'étaient absolument pas standardisés (lorsqu'ils étaient explicités par les

auteurs des publications).

Parallèlement, dans de nombreux laboratoires, dont celui de D'Herelle, des travaux expérimentaux *in vitro* mirent en évidence certaines caractéristiques fondamentales des phages : taille, capacité de résistance aux contraintes du milieu extérieur (chaleur, pH, agent chimique...), propriétés antigéniques. De 1932 à 1942, Gratia tenta de mettre en évidence la nature virale des phages, en comparant leurs propriétés à celles des rares virus déjà étudiés (comme le virus de la mosaïque du tabac ou de la glasserie du ver à soie). Bien qu'il semble rétrospectivement qu'il fit une parfaite démonstration de la nature virale des phages, ses contemporains rejetèrent en majorité ses conclusions [52].

Malgré la persistance de cette méconnaissance sur la nature des phages, les premières études pharmacologiques et pharmacocinétiques furent menées. Bien que les interprétations soient faussées par les lacunes scientifiques de l'époque, les résultats de certains de ces travaux furent et restent encore aujourd'hui très pertinents. Les observations les plus importantes dans ce domaine furent faites dès 1921 [53]. Malgré la faible technicité du matériel, Appelmans montra que les phages disparaissaient de la circulation générale en deux heures tout au plus après une injection par voie sanguine. D'autres auteurs mirent en évidence le rôle majeur du système réticulo-endothélial dans l'élimination des phages circulants [54]. Les conclusions de ces expériences ont depuis été confirmées par des travaux plus récents [55]. En 1931, des études *in vitro* montrèrent que l'activité phagique était neutralisée à des degrés variables par de nombreux fluides corporels dont le sérum humain, le liquide gastrique, ou la salive [56]. Ces résultats jetèrent le trouble sur les capacités thérapeutiques réelles des phages. Les arguments des détracteurs de la phagothérapie semblaient justifiés. Comment expliquer alors les succès *in vivo* de la phagothérapie? La compréhension des mécanismes immunitaires et l'étude des rapports entre les (suspensions de) phages et l'immunité aidèrent les thérapeutes à expliquer les succès de la phagothérapie. L'injection de phages s'accompagnait d'une augmentation des leucocytes circulants, de l'opsonisation, de la phagocytose (*in vitro* et *in vivo*) et de l'activité du système réticulo-endothélial ; Cela témoignait reflétait leur activité immunogène. Mais cette augmentation était-elle réellement due aux phages ou aux autres composants de la suspension? Petersen reprit l'ensemble des travaux sur le sujet et prouva que l'injection chez l'animal de protéines non spécifiques présentes dans les suspensions engendrait non seulement les mêmes effets sur la production de leucocytes, la phagocytose et l'activité du système réticulo-endothélial, mais dans l'étude de modèles animaux, avait un rendement, lorsqu'elle était efficace, identique à celui de la phagothérapie [48]. Larkum développa alors la théorie que les suspensions de phages n'avaient non pas une activité lytique propre mais qu'elles agissaient plutôt comme une vaccine, en stimulant une réponse immunitaire spécifique (travaux de D'Herelle sur la barbone) [57]. Les travaux d'Arnold et Weiss étayaient cette idée. Ils démontrèrent en 1924 que l'injection de suspension de phages

stimulait l'immunité contre la cible des phages et non contre le phage lui-même [48]. Pour de nombreux chercheurs, l'ensemble de ces travaux mettaient en évidence que l'activité du phage *in vitro* ne se reproduisait pas *in vivo*, et que l'efficacité partielle des suspensions était principalement due aux composants non phagiques. Les phages étaient inactifs *in vivo*. Le manque d'alternative antibactérienne permit la poursuite de leur utilisation dans le traitement des infections bactériennes.

Dans le même temps, D'Herelle défendait invariablement ses idées princeps:

- Le phage est « vivant »
- Il n'existe qu'une seule espèce capable de s'adapter à n'importe quel hôte bactérien (alors qu'il fut clairement démontré dès 1928 que les propriétés antigéniques et d'ultracentrifugation des phages étaient suffisamment variables pour qu'il s'agisse de structures différentes)
- Son rôle dans l'immunité est majeur.

Il n'hésita pas à critiquer avec mauvaise foi les travaux qui le contredirent.

Bénéficiant malgré tout d'une réputation internationale, D'Herelle devint en 1928 professeur dans la célèbre Université de Yale, où fut créé spécialement pour lui, une chaire de « protobiologie ». Puis pour des raisons obscures, il en claqua la porte en 1933, et partit fonder avec l'un de ses plus fervents disciples, Eliava, un Institut dans la jeune République Soviétique de Géorgie. Le but de cette structure était de promouvoir le développement de la phagothérapie en Union Soviétique. Malgré le décès tragique d'Eliava en 1937, l'Institut perdura tout au long des années de communisme. Il survécut à la guerre civile de 1991 qui suivit l'effondrement du bloc soviétique, et continue encore aujourd'hui, dans des conditions extrêmement difficiles à produire des phages à des fins thérapeutiques.

De retour à Paris, tout en poursuivant ses travaux de recherche fondamentale, il céda l'exploitation de sa découverte au laboratoire « Robert et Carrière » qui devint plus tard Synthélabo (filiale de l'Oréal). Le « laboratoire du bactériophage » fabriqua et commercialisa des suspensions buvables de phages aux noms très explicites tel que « Bacti-Intesti-Phage » pour le traitement des entérites coliques et des diarrhées infantiles, ou « Bacti-Pyelo-Phage » pour le traitement des colibacilluries, des pyélonéphrites et des cystites. De nombreux autres laboratoires dont Eli Lilly Compagny (US) se lancèrent dans ce commerce. La qualité des produits phagiques n'était cependant pas toujours assurée. À la limite du charlatanisme, un de ces laboratoires n'hésita pas à vendre une suspension aux multiples vertus qui se vantait en plus du traitement de nombreuses infections bactériennes de pouvoir soigner l'herpès, l'urticaire et l'eczéma. Pis encore, d'autres laboratoires sans scrupule, commercialisèrent des suspensions qui ne contenaient aucun principe lytique (en fait les stabilisants utilisés par ces fabricants détruisaient les phages) [58].

Au début des années trente, plusieurs points inquiétaient les autorités sanitaires :

- la méconnaissance sur la nature exacte du phages.
- les résultats des expériences sur la neutralisation de l'activité des phages par de nombreux liquides biologiques, et ceux des études pharmacocinétiques,
- Les nombreux échecs de la phagothérapie dans les modèles animaux et les résultats variables « d'essais cliniques » de qualité scientifique souvent médiocre,
- Le développement anarchique de la commercialisation de suspensions à l'échelle mondiale.

Ainsi en 1934, une revue de l'ensemble des travaux portant sur la phagothérapie fut réalisée à la demande de « The Council on Pharmacy and Chemistry » [48-50]. Cette institution, ancêtre de la Food and Drugs Administration (FDA), créée en 1905 par l'école de médecine américaine devait juger, comme le fait l'A.F.S.S.A.P.S. aujourd'hui en France, de la qualité et de l'efficacité de produits pharmaceutiques avant d'autoriser leur commercialisation aux Etats-Unis. Les membres du Conseil s'inquiétant de la croissance du marché des suspensions de phages, malgré leur refus de l'inclure dans la pharmacopée américaine, demandèrent à deux médecins Eaton (un microbiologiste) et Bayne-Jones (un infectiologue) de reprendre les études les plus pertinentes à leurs yeux permettant d'affirmer ou d'infirmer le potentiel thérapeutique des phages. Leurs conclusions basées sur l'analyse d'une centaine d'études furent sans appel:

« la nature des phages reste inconnue et D'Herelle n'a toujours pas fait la démonstration de sa théorie ».

« Le caractère vivant des phages n'ayant pas été démontré, leur capacité de lyse n'a rien de vital ».

« Les capacités lytiques du phage sont inhibées *in vivo* par de nombreux fluides corporels dont le sérum humain ».

« De nombreux éléments entrant dans la composition des suspensions de phages peuvent avoir un effet bactéricide direct ou indirect (immunogène) ».

« Aucune preuve du caractère bactéricide du bactériophage *in vivo* n'a été faite excepté dans la vessie et dans les collections ouvertes où de grandes quantités de phages peuvent être introduites ».

« L'efficacité du phage est démontrée uniquement dans les infections urinaires basses à *Escherichia coli* et à *Staphylococcus aureus* et dans les infections localisées à staphylocoque. Pour les autres, les résultats sont trop contradictoires et les études de bien trop mauvaise qualité scientifique »

« Les résultats favorables peuvent aussi être attribués à une immunité induite par d'autres composants (des débris bactériens, par exemple) de la suspension de phages »

Une fois encore, malgré les conclusions accablantes de Eaton et Bayne-Jones, les travaux et surtout les « essais cliniques » se poursuivirent faute d'alternative.

Au début des années quarante, trois évènements majeurs allaient néanmoins sceller l'avenir de la phagothérapie. Une nouvelle étude, conduite de nouveau à la demande de « The Council on Pharmacy and Chemistry », concernait l'évolution des connaissances sur les phages et leur emploi thérapeutique [59, 60]. Krueger et Scribner, les auteurs sollicités, reprirent comme leurs prédécesseurs, les travaux les plus pertinents permettant de déterminer la nature des phages et d'évaluer la phagothérapie.

Sur la nature et les propriétés des phages, les deux biologistes furent formel:

- Les phages sont des protéines de haute masse moléculaire synthétisées par les bactéries sous forme d'un précurseur inactif lors de phases de métabolisme intense. Ce précurseur est activé par des phages matures dont l'activité est conditionnée par l'environnement.
- Ils sont neutralisés par de nombreux fluides corporels et par les différents niveaux de la réponse immunitaire.
- L'activité lytique ne peut se manifester que lorsque le ratio phage-bactérie a atteint un seuil critique.
- Le spectre d'activité d'une suspension est limité car les phages sont très spécifiques de structures antigéniques bactériennes. L'autre conséquence directe de cette spécificité est la fréquence des échappements thérapeutiques puisque les bactéries peuvent s'adapter (théorie lamarckienne sur les capacités d'adaptation des espèces).

Quant à la phagothérapie, les conclusions n'allaient guère changer en six ans:

- La phagothérapie n'est toujours pas expliquée et explicable sur un plan physiologique.
- Le phage a bien un effet lytique *in vitro*, mais rien ne prouve que cet effet existe *in vivo*.
- Des suspensions très purifiées ont eu de faibles rendements lors d'essais thérapeutiques sur l'homme et l'animal.
- Les phages peuvent agir en « opsonisant » les bactéries, favorisant ainsi leur phagocytose.
- La mauvaise qualité des suspensions peut expliquer l'effet antibactérien attribué aux phages: Les débris bactériens souillant les suspensions peuvent stimuler l'immunité spécifique et l'introduction de protéines induit une réponse immune non spécifique qui peut aussi participer à la guérison.
- Les essais cliniques ne sont toujours pas concluants car leur qualité ne s'est pas

améliorée et dans les rares cas où les suspensions ont été efficaces, elles ne le sont pas plus que les autres thérapies habituellement employées.

- Mais c'est le dernier point qui inquiète le plus. Les suspensions de phages peuvent représenter un danger, soit en déclenchant des réactions anaphylactiques potentiellement graves, soit par l'intermédiaire des toxines bactériennes qui entrent dans la composition des impuretés des suspensions.

Dès lors, trop de doutes planant sur l'efficacité et la dangerosité de cette thérapeutique, les membres de « The Council on Pharmacy and Chemistry » refusèrent définitivement d'officialiser la phagothérapie et en interdirent l'accès au marché américain.

L'un des deux autres événements majeurs au début de la Seconde Guerre Mondiale fut l'avènement, en Occident, de l'antibiothérapie. Développés et étudiés depuis la découverte de la pénicilline par Sir Fleming en 1929, les quelques antibiotiques disponibles à l'époque susciterent, grâce à leurs très nombreuses qualités, un réel espoir dans la lutte contre les maladies bactériennes. Unanimement et à juste titre, la communauté scientifique les jugea très supérieurs à la phagothérapie. Cette dernière fut dès lors abandonnée en Occident au bénéfice d'un des progrès thérapeutiques majeurs du vingtième siècle.

Enfin la troisième et dernière fut comme nous le montrerons dans le paragraphe suivant, la Seconde Guerre Mondiale.

Ces deux décennies furent extrêmement riches en travaux sur la phagothérapie. Hélas, le manque de méthodologie et la mauvaise qualité des essais cliniques et thérapeutiques, ainsi que le manque de moyens techniques et de rigueur dans la production des suspensions de phages ne permit jamais de faire la démonstration de l'efficacité *in vivo* de ces virus de bactérie. En Occident, cette thérapeutique devint rapidement obsolète et connut une lente agonie.

La seule satisfaction pour D'Herelle au début des années quarante vint des travaux d'Helmut Ruska. Ce dernier, en appliquant la microscopie électronique à l'étude des phages confirmait ses deux hypothèses de départ: les phages sont bien une entité « vivante » et ce sont des virus.

2.5.2 1941-1980: A l'Ouest rien de nouveau

Durant la seconde guerre mondiale plusieurs belligérants continuèrent néanmoins à utiliser la phagothérapie. Allemands et japonais en faisaient usage dans le traitement de nombreuses pathologies. Des flacons contenant des suspensions de phages faisaient même

partie de l'équipement individuel des soldats de la Wehrmacht. À l'Est, les Soviétiques utilisèrent aussi à grande échelle les bactériophages durant cette période. Des unités de fabrication construites sur le modèle de l'Institut Eliava de Tbilissi, purent acquérir durant les années qui précédèrent le conflit une grande expérience dans le maniement des bactériophages. Les médecins de l'Armée Rouge en firent naturellement usage tout au long du conflit et purent accroître le nombre des indications de la phagothérapie (prophylaxie des diarrhées bactériennes, prévention et traitement de la gangrène...) [61, 62].

Dans le camp allié, l'effort de guerre dans le domaine de la recherche pharmaceutique fut axé sur deux grandes voies:

La mise au point d'antipaludéens de synthèse. Les Japonais ayant la main mise sur les cultures de Quinquina en Extrême-Orient, il était inenvisageable pour les Américains de mener une offensive dans la région pacifique fortement impaludée sans traitement pour les GI's. Le risque était trop grand et celui que Napoléon appelait « le général fièvre » aurait eu plus rapidement raison des troupes que l'armée de l'empire nippon.

Le développement de la production d'antibiotiques. L'expérience du premier conflit mondial avait parfaitement montré que malgré une chirurgie de guerre relativement efficace, l'absence de traitement anti-bactérien engendrait un nombre considérable de pertes par infection des blessures de guerre et des sites opératoires. La science semblait avoir, au début des années trente, apporté la solution à ce dramatique problème: les antibiotiques. Bien que leur usage chez l'homme n'en soit qu'à ses balbutiements au début du conflit mondial (obtention d'une première forme chimiquement stable de pénicilline en 1939), leur grande efficacité et bien d'autres avantages comme la facilité de production, de conditionnement et d'utilisation encouragèrent leur utilisation à une plus grande échelle. La production massive de sulfamide et de pénicilline (seuls antibiotiques testés au début du conflit) devint logiquement une priorité et leur usage fut quasi exclusivement militaire. L'antibiothérapie devint le traitement antibactérien « miracle », les champs de batailles devenus champ d'investigation à grande échelle permirent de confirmer son efficacité clinique.

Même si c'est un détail de cette période troublée, l'aboutissement de ces développements participa grandement à la victoire alliée. Quant aux phages peu efficaces, difficiles d'utilisation et de production, ils étaient incapables de concurrencer les antibiotiques. Pourtant, en 1943, R.J. Dubos conduisit une série de travaux d'excellente qualité sur un modèle murin d'encéphalite à *Shigella dysenteriae*. Ils lui permirent de conclure que les phages injectés à forte dose par voie intra-péritonéale pouvaient aller se multiplier au niveau des sites cérébraux infectés et traiter l'infection [63]. Ce dernier sursaut de la phagothérapie fut vain, il était déjà bien trop tard.

À la même période, le « Laboratoire du Phage » fondé à Paris par D'Herelle fut réquisitionné par les troupes d'occupation afin qu'elles puissent se réapprovisionner. Privé de son outil de travail, il suspendit ses travaux, quitta la Capitale et connu l'exode. La paix retrouvée, d'Herelle dont la personnalité à l'époque de sa magnificence avait inspiré à Sinclair Lewis (Prix Nobel de Littérature en 1930 avec *Le Moine*) le personnage d'Arrowsmith (Héros du roman du même nom, Prix Pulitzer en 1925) connut le même déclin que sa phagothérapie [64]. Malgré un dernier baroud d'honneur en 1949 lors d'un congrès à l'Institut Pasteur de Paris où il affirma que « tout est phage », il s'éteignit dans un anonymat quasi-général, comble du destin, la même année que Twort.

Après la guerre, l'industrie pharmaceutique occidentale consciente des bénéfices substantiels qu'elle tirerait de la mise au point de nouveaux antibiotiques se lança dans « la course à l'armement ». Quelques laboratoires indépendants continuèrent malgré tout à produire (quasi artisanalement) des suspensions de phages.

La scission du Monde en deux grands blocs donna, malgré elle, à la phagothérapie une dimension politique qui perdure de nos jours [65-67]. En effet, les Soviétiques qui avaient investi dans cette thérapeutique continuèrent à l'utiliser et favorisèrent la fabrication et la distribution des suspensions dans toutes les Républiques de l'Union Soviétique et dans les pays « frères » du Bloc de l'Est. De 1940 à 1950, les travaux planifiés par les fameux plans quinquennaux de Staline furent axés sur la mise au point de nouvelles formes galéniques et sur l'évaluation de leur efficacité. Des comprimés, devant permettre aux phages de résister à l'acidité gastrique, furent mis au point et testés avec succès en prophylaxie et dans le traitement de la dysenterie et de la typhoïde. Des « poudres » et des compresses imprégnées de phages, facilitant le traitement des plaies humides furent aussi élaborées [61].

Pendant ce temps, en Occident, les phages connurent une seconde carrière beaucoup plus « glorieuse ». Aux Etats-unis, Delbrück et Luria fondèrent en décembre 1941 le « Cold Spring Harbor Laboratory Phage Group ». La plupart des membres (physiciens, physiologistes, etc...) qui rejoignirent l'hydre « Delbrück et Luria » étaient des immigrés européens qui avaient fui les régimes totalitaires européens. Pour des raisons de sécurité nationale (état de guerre oblige) le gouvernement américain ne les autorisa pas à contribuer à des travaux scientifiques liés de près ou de loin aux programmes militaires. Le but initial de ces réunions annuelles était de découvrir comment les phages agissaient sur les bactéries et de démontrer, par une mise en commun des connaissances, la réalité des hypothèses envisagées. Les résultats des études menées par cette singulière « colonie de vacances » dépassèrent largement le domaine des phages. Ils aboutirent à la compréhension des mécanismes de l'infection virale, et jetèrent surtout les bases de la génétique et de la biologie moléculaire moderne. On peut considérer qu'au moins trois Prix Nobel de Science

furent plus ou moins directement liés aux travaux du « Cold Spring Harbor Laboratory Phage Group »[31].

Entre 1950 et 1960, à l'Est, les recherches toujours planifiées prirent une nouvelle direction. Les chercheurs et les médecins devaient essayer de mettre au point des traitements combinant phages et antibiotiques. *In vitro*, il fut démontré que les antibiotiques augmentaient le titre des suspensions de phages mais aucune explication ne fut trouvée. Des modèles animaux mirent en évidence que l'utilisation des phages en synergie de l'antibiothérapie n'était efficace que dans certaines conditions très expérimentales. Les premiers essais cliniques ne trouvaient un bénéfice à cette association que dans la prévention des récurrences d'infection. Des travaux sur les rapports entre phage et immunité furent aussi menés. Quels que furent la qualité et les résultats de ces études, les phages continuèrent dans tous les « Pays de l'Est » à faire partie des traitements anti-infectieux au même titre que les antibiotiques [61].

À l'Ouest en revanche, même si des suspensions continuèrent à être commercialisées jusque dans les années soixante-dix (en France, les derniers produits phagiques disparurent du VIDAL dans les années soixante-dix au grand dam de Réga-Clemenceau légataires des idées de D'Herelle) la phagothérapie était plus que dépassée. Quelques publications anecdotiques rapportant les succès de l'utilisation des phages en thérapeutique émaillèrent la littérature médicale, mais aucune ne réussit à susciter un nouvel engouement [68-71]. L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) réévalua les phages par rapport à l'antibiothérapie dans le traitement du choléra. Bien que la qualité de ces travaux soit très critiquable, les conclusions fustigèrent de nouveau la phagothérapie [72, 73]. Désormais, les phages étaient cantonnés à un rôle d'outil de recherche et de biologie moléculaire et il en était définitivement fini de l'usage thérapeutique.

Durant toute cette période, aucune publication, aucun résultat des travaux menés à l'Est sur les phages, ne franchirent le « Rideau de Fer ». Pourtant, des publications récentes font état du colossal travail effectué par les chercheurs soviétiques, pour comprendre et améliorer la phagothérapie. À titre d'exemple, en 1961, les Géorgiens menèrent une étude sur le rôle prophylactique des phages sur une cohorte de plus de trente mille sujets. Comme tous leurs précédents travaux, les résultats furent, bien entendu, en faveur de la phagothérapie [51, 61, 62, 74].

Il fallut attendre près de quarante ans pour qu'à l'Ouest cette « vieille thérapeutique » oubliée sorte de l'ombre.

2.5.3 Des années 80 à nos jours: La redécouverte

En quarante ans, l'antibiothérapie devint le traitement de référence antibactérien, incontesté et incontestable. Son utilisation massive, voire excessive, aussi bien en médecine humaine et vétérinaire que dans l'agriculture et l'agronomie ne fut pas sans conséquences. Très tôt après le début de l'exploitation de sa découverte Sir Flemming avait décrit des souches de staphylocoques capables de résister à la pénicilline. Il avait justement appréhendé le risque de sélectionner des souches insensibles, et tenta de convaincre qu'un emploi inconsidéré de sa découverte la rendrait rapidement caduque. Mais sa mise en garde eut peu d'échos.

Longtemps l'industrie pharmaceutique se donna les moyens d'enrichir l'arsenal thérapeutique en mettant au point de nouvelles molécules. Le marché pour ces nouvelles familles d'antibiotiques était florissant et extrêmement rentable.

En médecine humaine, les mauvaises habitudes de prescription devinrent « consensuelles ». Ainsi, les médecins confrontés à une résistance bactérienne avaient la possibilité de recourir à un antibiotique plus « fort » de la même ou d'une autre famille de molécules. La mise au point continue de nouvelles molécules rendait toujours possible le contournement de ce type d'obstacle. Peu à peu les antibiotiques devinrent un produit d'usage courant.

En médecine vétérinaire, les antibiotiques furent aussi utilisés *larga manu*, non seulement comme agent anti-infectieux thérapeutiques, mais aussi prophylactiques, afin par exemple, d'éviter la propagation d'épidémies dans les élevages industriels. Leur usage comme probiotique ou facteur de croissance notamment chez les porcins et les bovins fut, à une époque, quasi général.

Avec tous les antibiotiques disponibles, il semblait inconcevable qu'une infection bactérienne ne puisse pas être traitée.

Dès lors, les grands laboratoires jugèrent l'investissement en temps et en argent dans la découverte de nouvelles familles de molécules peu intéressantes. Ils arrêtaient le financement des travaux de recherche et se contentèrent d'améliorer et d'exploiter la grande gamme de traitements déjà disponibles [75].

La conséquence de cette mauvaise gestion ne se fit pas attendre. Sous l'effet d'une pression de sélection omniprésente, les espèces bactériennes se sont « adaptées » et des clones capables de se développer malgré la présence d'antibiotiques ont émergé. Pour la première fois, vers la fin des années soixante-dix, des médecins furent confrontés à des infections bactériennes pour lesquelles les marges thérapeutiques étaient anormalement étroites dues à des clones bactériens présentant des phénotypes de résistance hors du commun. Les études épidémiologiques montrèrent que ce type de bactéries était principalement isolé en milieu hospitalier (ou dans des structures médicalisées), où ils touchait le plus souvent des patients extrêmement fragilisés (âges extrêmes, greffés, patients de réanimation, mucoviscidose, etc). Malgré ces constatations alarmantes, les habitudes d'utilisation et de

prescriptions des antibiotiques ne changèrent pas. L'émergence exponentielle de clones de plus en plus résistants devint rapidement un problème de santé publique internationale. En un demi-siècle, la médecine moderne occidentale se trouvait face à un problème majeur qu'elle avait en très grande partie engendrée. Certains allèrent jusqu'à craindre l'entrée de la médecine dans une « ère post-antibiotiques ». Une ère où, au-delà des terribles conséquences que pourrait avoir la propagation et la multiplication de ces clones sur traitement des maladies bactériennes, une menace extrêmement lourde pèserait sur l'ensemble de la médecine moderne. En effet, aujourd'hui, le succès de nombreux protocoles de prises en charge médico-chirurgicale impose une capacité à prévenir et à mettre en échec toute forme d'infection.

L'électrochoc provoqué par la multiplication d'épidémies à germes multirésistants obligea alors les médecins et les grandes instances sanitaires à revoir complètement leurs pratiques de l'antibiothérapie. Des études furent initiées pour comprendre comment on en était arrivé à une telle situation. Quels mécanismes aussi bien moléculaires qu'épidémiologiques entraînent en jeu? Et quels étaient alors les nouveaux moyens de lutter contre la propagation de la multirésistance:

La prévention: bon usage de l'antibiothérapie, développement de l'hygiène hospitalière, prise de conscience collective de la nécessité de moins utiliser les antibiotiques,...

Le développement de nouvelles armes antibactériennes.

Actuellement il existe plus de 15 classes d'antibiotiques, dont aucune n'a échappé à un mécanisme de résistance [76]. Les connaissances scientifiques concernant la pathogénicité et les mécanismes moléculaires de résistance de nombreux microorganismes ne cessent de s'accroître, et depuis une dizaine d'années des efforts considérables dirigés vers la recherche de nouvelles molécules antibactériennes ont été réalisés. La littérature scientifique récente foisonne de publications rapportant la découverte de nouvelles substances antimicrobiennes et l'identification de cibles moléculaires bactériennes [77]. Malgré cela aucune nouvelle classe thérapeutique, hormis les oxazolidinones, n'a vu le jour depuis presque quarante ans. Pourtant, certains champs d'investigation semblent prometteurs, en particulier le domaine des peptides antimicrobiens, des inhibiteurs de facteurs de virulences ou de la communication cellulaire.

C'est dans ce contexte que la phagothérapie suscite un nouvel intérêt en Occident. Elle fut aidée en cela par deux séries de travaux publiés durant les années quatre-vingt.

De 1985 à 1987, pour la première fois depuis près de cinquante ans, une équipe de l'Est publia en langue anglaise, dans une revue occidentale, les résultats de son expérience de l'usage de la phagothérapie chez l'Homme. Slopek *et al.* de l'Institut Wroclaw (Pologne)

montrèrent au travers de sept articles, les bénéfices qu'ils avaient pu tirer de l'utilisation de phages dans le traitement d'infections à germes multirésistants en impasse thérapeutique [78-84]. Cinq cent cinquante patients, dont l'âge était compris entre 12 mois et 86 ans, furent inclus dans cette cohorte. L'étude fut réalisée sur dix sites différents répartis dans trois villes de Pologne. Dans 518 cas, l'antibiothérapie (dont les auteurs ne précisent jamais la nature et les modalités d'administration) utilisée préalablement, se révéla inefficace pour des raisons de résistance bactérienne. Mais elle fut arrêtée à l'initiation de la phagothérapie dans 398 cas. Les infections prises en charge étaient « spontanées » ou post opératoires. Les germes isolés et traités appartenaient aux genres: Staphylococcus, Salmonella, Klebsiella, Escherichia, Proteus et Pseudomonas. Dans 372 cas, les patients avaient une infection monomicrobienne dont 73% étaient dues au genre Staphylococcus.

L'étape préalable à tout traitement était la sélection *in vitro*, parmi les 250 espèces conservées à l'Institut, des phages lytiques les plus efficaces sur les souches bactériennes isolées. Les modalités d'administration de la phagothérapie furent les suivantes:

Par voie orale, en trois prises quotidiennes, post prandiale et après neutralisation de l'acidité gastrique par une solution de bicarbonate de soude.

Par topiques locaux, (suspension ou compresses imbibées, collyres, gouttes auriculaires ou nasales) sur infections cutanéomuqueuses.

Par injections intrapéritonéales, intrapleurales ou intraarticulaires pour les collections fermées.

Durant le traitement, des prélèvements bactériologiques systématiques de contrôle permirent de s'assurer de l'efficacité des phages et de l'absence de sélection de souches bactériennes résistantes. La durée du traitement fut de 1 à 16 semaines. Les seuls critères de bonne réponse thérapeutique pris en compte par les auteurs furent cliniques et se limitaient à une régression des symptômes ou des lésions. Dans ces conditions, 508 (92.4%) patients furent considérés comme guéris. Les résultats selon la pathologie traitée s'étalant de 75% pour les ulcères variqueux surinfectés à 100% pour les gastroentérites et les furonculoses. Les auteurs notèrent que les facteurs de mauvaise réponse étaient un âge supérieur à 60 ans, le sexe masculin et la prise contemporaine d'antibiotiques.

Hélas, malgré l'envergure de cette cohorte, et même si les résultats sont de prime abord assez impressionnants, comme près d'un demi-siècle auparavant ces travaux n'ont qu'une très faible valeur scientifique. En effet, ils sont faussés par de nombreux biais en raison de qualités méthodologiques très insuffisantes (absence de randomisation, absence de groupes contrôles, subjectivité des critères d'évaluations de l'efficacité, poursuite des antibiotiques dans plus de 50% des cas). Il faut alors admettre que le seul mérite de ce travail titanesque est d'avoir interpellé la médecine occidentale sur les capacités potentielles de la phagothérapie.

L'autre série de publications fut le fruit des investigations de deux vétérinaires britannique

[85-87]. En 1982, Smith et Huggins, reprirent les travaux de phagothérapie sur les modèles expérimentaux murins là où, en 1943, Dubos les avaient arrêtés malgré leur succès. Ces deux auteurs initièrent une première étude sur l'efficacité d'un phage anti-colibacille sur un modèle murin de septicémie-encéphalite à *Escherichia coli* K1. Cette entérobactérie très pathogène est responsable de méningites et de septicémie chez l'animal et l'homme. Ils n'utilisèrent parmi ces phages que ceux ayant pour cible le facteur de virulence de la bactérie: l'antigène K1. La première étape de leur travail fut de sélectionner le phage le plus actif *in vitro* sur la souche bactérienne cible (moins de 10 unités formant plages (UFP) de phages étaient capables de lyser *in vitro* $3 \cdot 10^8$ UFC de la souche de *E.coli*). L'injection intramusculaire d'une seule dose de phages jusqu'à un minimum de 10^4 UFP, simultanée à l'inoculation de 10^7 UFC de *E. coli* dans un autre site, réduisait la mortalité des souris de 100% [86]. La mortalité était aussi significativement réduite si les phages étaient administrés 8 heures après l'inoculation bactérienne. Ils démontrèrent aussi que les phages administrés en une seule injection intramusculaire avaient de meilleurs résultats que l'antibiothérapie intraveineuse préconisée à l'époque dans cette pathologie. Dans un cas, les prélèvements bactériens de contrôle faits sur une des souris traitées, isolèrent une souche d'*Escherichia coli* résistante aux phages, mais ne présentant pas à sa surface l'antigène K1, sa virulence était donc très atténuée. Les auteurs conclurent que les phages sur ce modèle avaient une efficacité supérieure à l'antibiothérapie et que si une des bactéries devenait résistante, cela se faisait aux dépens de sa virulence.

La fiabilité statistique et la reproductibilité des résultats de Smith et Huggins fut validée par une équipe de biostatisticiens qui reproduirent ces expériences quelques années plus tard [88].

En 1983, les deux chercheurs étudièrent la phagothérapie dans le traitement et la prévention des diarrhées à *Escherichia coli* entéropathogène, constamment létales, chez des veaux, des porcelets et des agneaux nouveau-nés [85]. Une dose de 10^{11} UFP de phages administrée per os 1 heure et 8 heures après l'administration entérale de 10^9 UFC de *E. coli* prévenait la maladie et la mortalité de 100% des animaux. En revanche si les phages étaient administrés à la phase d'état de la maladie, les symptômes étaient atténués et la mortalité réduite mais de manière non significative. Toujours dans cette même étude, ils démontrèrent que l'utilisation de plusieurs types de phages anti-*E. coli* prévenait la sélection de bactéries résistantes (comme ce fut le cas dans leur première étude). Les deux biologistes montrèrent de plus, que l'usage prophylactique de phages administrés per os protégeait de l'infection en diminuant la densité du germe le tube digestif de l'animal traité sous un seuil critique et que les phages persistaient dans le tube digestif des animaux jusqu'à l'éradication bactérienne complète.

En 1987, ils terminèrent leurs travaux en déterminant des facteurs environnementaux capables d'inhiber l'activité anti-bactérienne des phages. Ils mirent en évidence qu'une

température non optimale, le pH gastrique acide et l'immunité adaptative pouvait neutraliser les phages [87].

Les découvertes ou redécouvertes de ces deux vétérinaires furent fondamentales dans le regain d'intérêt pour la phagothérapie [30, 61, 62, 74, 89-94]. Pour la première fois en quarante ans, une étude sérieusement dirigée, scientifiquement et statistiquement fiable permettait de démontrer qu'une thérapeutique considérée peut être à tort comme inefficace et obsolète pouvait, si elle est utilisée avec rigueur, éradiquer des germes *in vivo*. La qualité de cette série de travaux fut déterminante quant aux connaissances pratiques et fondamentales sur la phagothérapie (pharmacocinétique, pharmacodynamique, conditions physico-chimiques et immunitaires d'échec thérapeutique...).

De nombreux travaux furent initiés dans les années qui suivirent. Berchieri *et al*, poursuivant ces travaux vétérinaires, démontra l'efficacité des phages sur des modèles de diarrhée du poulet à *Salmonella enterica* Typhimurium [95, 96]. Soothill, qui reste un des plus fervents promoteurs actuels de la phagothérapie, reprit les travaux de Smith en 1992 [95]. Ses expériences furent menées sur des modèles murins de sepsis-péritonite à *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* multirésistants. Dans les deux premiers modèles, de très faibles concentrations de phages, administrés par voie intrapéritonéale simultanément à l'inoculation bactérienne (10^2 UFP pour 10^8 UFC dans le modèle d'infection à *A. baumannii*), furent suffisantes pour traiter les animaux. En revanche, dans le modèle d'infection à *S. aureus*, les phages furent inefficaces, même à forte concentration. Avec le même phage anti-*pseudomonas* que celui utilisé dans le modèle d'infection murine, Soothill montra que la phagothérapie pouvait être utilisée pour prévenir la destruction des greffons cutanés par *P. aeruginosa*, *in vitro et in vivo* [97, 98].

Beaucoup de travaux récents, qui sont aussi des études pré-cliniques préparant l'usage des phages comme substitutif à l'antibiothérapie chez l'Homme utilisent des modèles de sepsis-péritonite murins. Ces modèles d'infections létales qui évaluent généralement l'efficacité de phages spécifiques de bactéries d'intérêt clinique chez l'Homme, tentent aussi de mettre en évidence les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques influençant la réponse thérapeutique. Merrill *et al* dans un modèle d'infection à *E. coli* ont mis en évidence une clairance rapide des phages de la circulation sanguine des souris infectées, par le système réticuloendothélial. Cependant ils ont montré qu'il était possible de sélectionner, *in vivo*, des phages mutants dont l'efficacité thérapeutique était accrue, capables d'échapper au système immunitaire inné, et de persister plus longtemps à une concentration élevée dans l'organisme des animaux [99]. Récemment, l'utilisation de phages spécifiques dans la prévention ou le traitement de sepsis à *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine a été évaluée par Biswas *et al* dans un modèle murin de sepsis-péritonite létales. Ces auteurs ont montré que les phages virulents, administrés par voie intra-péritonéale, 45 minutes après l'inoculation bactérienne, prévenaient la mortalité chez tous les animaux traités jusqu'à un

rapport de concentration phages/bactéries (= multiplicity of infection ou MOI) de 1. En revanche, l'efficacité thérapeutique était clairement dose dépendante. Chez des animaux moribonds (18 à 24 heures après l'inoculation bactérienne), une seule injection de phages permettait d'éviter le décès de 50% des animaux. Ils démontrèrent enfin, au cours de la même expérience, que l'efficacité thérapeutique était liée aux phages viables et non pas à la présence de substances potentiellement immuno-modulatrices dans la suspension [100]. Les travaux que Soothill avait menés sur un modèle murin d'infection létale à *S.aureus* ont été récemment repris par Matsuzaki *et al.* Ces auteurs ont montré qu'un phage adapté et virulent *in vitro*, administré par voie intra-péritonéale, 1 heure après l'inoculation bactérienne, prévenait le décès de 100% de souris jusqu'à un MOI minimal de 1 [101]. Cependant, comme dans d'autres d'études plus récentes, il s'agit à nouveau d'un modèle d'infection létale éloignée des conditions cliniques humaines [102-104]. Quelques études utilisant des modèles d'infection plus complexes (soit parce que le site d'administration des phages est différent du site d'inoculation des bactéries, soit parce que le site infecté lui-même est plus complexe), ont récemment rapporté des résultats contradictoires [105-107].

Les études pré-cliniques actuellement les plus avancées touchent le domaine des infections du tractus digestif à *E. coli* et à *Vibrio cholerae*. Une étude de tolérance orale de phage anti-*E. coli* sur une petite série de patients a récemment été publiée [6, 16, 108-113]. En outre, un travail intéressant, mené par une équipe du Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta, a montré que des cathéters imprégnés de bactériophages pouvait prévenir la colonisation et la formation de biofilm par *Staphylococcus epidermidis* [114].

Toutes ces études intègrent dans leurs résultats, à un niveau variable, des données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, soulignant la complexité des interactions ayant lieu *in vivo* entre le phage, la bactérie et l'hôte. Aussi certaines équipes de recherche expérimentale et de biostatisticiens ont axé spécifiquement leurs travaux sur la compréhension de ces interactions. Certaines équipes travaillent à un niveau purement théorique, à partir de modélisations mathématiques complexes intégrant des données susceptibles de modifier les interactions entre phages et bactéries chez un être vivant et aussi à partir d'observations émanant d'études expérimentales réalisées par d'autres auteurs [88, 115-119]. D'autres équipes travaillent à un niveau plus expérimental [120, 121].

Des études pharmacocinétiques ont montré que les phages pouvaient diffuser dans nombre de compartiments de l'organisme après administration entérale et parentérale, mais qu'ils étaient rapidement éliminés de la circulation sanguine par le système réticulo-endothélial et abondamment excrétés dans les urines [92, 99, 122, 123]. Les phages sont aussi susceptibles

d'être neutralisés par des anticorps spécifiques en réponse à la stimulation du système immunitaire adaptatif [123, 124]. Cependant des travaux récents étudiant les interactions

entre le système immunitaire et les phages ont démontré que ces derniers pouvaient avoir une activité immuno-modulatrice bénéfique sur la réponse inflammatoire à l'infection [125-127].

Le traitement des infections bactériennes par les bactériophages est une idée séduisante qui mérite que l'on s'y intéresse. La littérature scientifique internationale récente sur le sujet atteste de son efficacité thérapeutique dans certains modèles expérimentaux et beaucoup d'auteurs souligne les avantages potentiels de la phagothérapie par rapport à l'antibiothérapie (**tableau I**)

Cependant, un premier point important est que ces modèles, souvent simples et intéressants pour étudier certaines données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques *in vivo*, ne sont pas suffisamment discriminants pour mettre en évidence une réelle efficacité thérapeutique des bactériophages étudiés, car trop éloignés des conditions cliniques.

Le deuxième point concerne les méthodes d'évaluation des phages *in vitro* rarement décrites dans les études, non standardisées et peu discriminantes. L'activité lytique des phages *in vitro* est le plus souvent évaluée en milieu liquide par des méthodes optiques dont le seuil de détection est de 10^6 UFC/mL.

Le troisième point concerne la nécessité d'un autre modèle reproductible et simple, permettant d'évaluer l'activité lytique d'un phage sur une bactérie non planctonique, donc proche de la situation généralement rencontrée dans un site infectieux *in vivo*.

Enfin le quatrième point concerne le type de suspension de phages à utiliser en thérapeutique : polyclonale ou bien monoclonale.

Ce sont les points que nous avons étudiés dans le travail expérimental que nous avons réalisé et que nous allons exposer dans les chapitres suivants.

Tableau I : Avantages et inconvénients des phages en thérapeutique

Avantages	inconvénients
Bactéricides Spectre d'hôte étroit Pas de sélection de résistance chez d'autres espèces ni de modification de la flore résidente chez l'hôte Innocuité, pas d'effet secondaire à priori Possibilité de sélectionner rapidement un nouveau phage actif en cas de développement de résistance au cours d'un traitement	Nécessité de connaître la bactérie en cause dans l'infection Immunisation possible de l'hôte en cas de traitement prolongé Développement de résistance possible par mutation des récepteurs spécifiques de la paroi bactérienne

III OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre objectif était d'évaluer *in vitro* l'efficacité d'une suspension polyclonale de phages anti-staphylococciques par des méthodes de vitesses de bactéricidie en milieu liquide

Puis nous avons développé au sein du laboratoire le modèle de caillots de fibrine pour évaluer l'efficacité de la suspension de phages sur des bactéries non planctoniques

Ensuite nous avons évalué cette suspension de phages *in vivo* dans deux modèles expérimentaux discriminatifs: modèles d'endocardite et d'arthrite du lapin

Enfin nous avons cherché à sélectionner un clone phagique potentiellement plus virulent vis

à vis d'une souche particulière de *Staphylococcus aureus*

IV MATERIELS ET METHODES

4.1 SUSPENSION DE BACTERIOPHAGES

Provenance

Nous avons utilisé une suspension de phages antistaphylococciques, commercialisée en Russie par la société pharmaceutique BIOMED[®]. La suspension nous a été fournie par le Dr Dublanche responsable du laboratoire de microbiologie du CHR de Villeneuve Saint-Georges.

Composition

Il s'agit d'une suspension polyclonale de phages composée d'un filtrat stérile et purifié obtenu à partir d'un phagolysat de souches de *S. aureus* parmi les plus pathogènes et le plus souvent incriminées en clinique.

Présentation

La suspension se présente sous forme d'un liquide clair translucide de couleur jaune citrin. Celle-ci est conditionnée dans des flacons de verre de 20 mL hermétiquement clos par un bouchon de caoutchouc cerclé d'une bague métallique (**Photo 1**)



Conservation

La suspension doit être conservée entre à 4°C dans un endroit sec à l'abri de la lumière.

Indications

Traitement curatif et prophylactique des infections à staphylocoque doré de l'enfant et de l'adulte. (*Traduction de la notice d'utilisation*)

Usage curatif

- Infection des voies respiratoires hautes et basses
- Infections cutanées : plaies surinfectées, abcès, panaris, phlegmon, furoncle, anthrax
- Infection abdominale : gastro-entérite, cholécystite
- Infections uro-génitales : Urétrite, cystites, pyélonéphrite, endométrite
- Infections ostéo-articulaires : arthrite, ostéomyélite.
- Sepsis.

Usage prophylactique

Sur les plaies susceptibles de se surinfecter

NB : Le fabricant précise que l'activité de la préparation doit être évaluée avant usage sur la souche *de S. aureus* isolée des prélèvements pathologiques.

Modalités d'utilisation (traduction de la notice d'utilisation)

En topique : sous forme d'irrigation ou de tamponnement sur des lésions superficielles.

Par inoculation :

- Dans le traitement des abcès
- Dans le traitement des ostéomyélites
- Dans le traitement d'infection des cavités naturelles de type pleurale, articulaire
- Dans le traitement des entérites

4.2 ÉTUDE DE L'ACTIVITE *IN VITRO* DE LA SUSPENSION DE PHAGES SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

La première étape de notre travail a été de déterminer *in vitro* les capacités lytiques de la suspension de phages sur *S. aureus* par diverses méthodes.

4.2.1 Spectre d'activité

Le spectre d'activité de la suspension a été évalué par la **méthode des spots** sur **117 souches** de ***Staphylococcus aureus*** issues de prélèvements pathologiques divers et extraites au hasard du souchier du laboratoire de bactériologie du CHU de Nantes.

Principe - Une goutte d'une suspension de phages, déposée à la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la bactérie à tester, est responsable d'une inhibition de croissance au niveau de la zone de dépôt si les bactéries sont sensibles.

L'interprétation est différente selon que l'on teste une suspension mono ou polyclonale.

Pour une suspension polyclonale:

L'inhibition complète de la croissance au niveau de la zone de dépôt signifie que la souche bactérienne est pleinement sensible à tous les clones de phages.

L'inhibition partielle de la croissance signifie que la souche bactérienne est insensible à certains clones de phages (le titre de phage actif est relativement moindre).

Une croissance homogène signifie que la bactérie est insensible à tous les clones.

Pour une suspension monoclonale:

L'inhibition partielle de la croissance permet de détecter la présence de clones bactériens résistants au sein de l'isolat étudié.

Méthode - L'inoculum bactérien et l'ensemencement de la gélose ont été réalisés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour la réalisation de l'antibiogramme par diffusion. A partir d'une culture de 24 heures, les suspensions bactériennes ont été standardisées à 0,5 Mc Farland puis diluées au 1/10. L'ensemencement a été effectué par écouvillonnage sur des géloses de Mueller-Hinton (MH). 10µL de la suspension de phages ont été déposés à la surface de chaque gélose. La lecture a été réalisée après 24 h d'incubation à 37°C.

4.2.2 Spécificité anti- *Staphylococcus aureus*

La méthode des spots a été appliquée sur des souches de staphylocoque à coagulase négative (SNC) et sur d'autres espèces bactériennes à Gram positif et négatif (**Tableau II**).

Tableau II : Bactéries étudiées pour l'étude de la spécificité de la suspension de phages

Germes étudiés	Nombre de souches	Germes étudiés	Nombre de souches
GRAM positif		GRAM négatif	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	49	<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9	<i>Proteus spp</i>	6
<i>Staphylococcus capitis</i>	11	<i>Klebsiella spp</i>	5

<i>Staphylococcus hominis</i>	9	<i>Citrobacter spp</i>	4
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	<i>Enterobacter spp</i>	4
<i>Staphylococcus simulans</i>	4	<i>Hafnia alvei</i>	1
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	<i>Haemophilus influenzae</i>	5
<i>Staphylococcus intermedius</i>	2	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	9		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5		
<i>Enterococcus spp</i>	5		
<i>Streptococcus spp</i>	5		

4.2.3 Titration de la suspension de phage par la méthode « en double couche »

La technique a été appliquée sur **4 souches cliniques de *S. aureus***

3 souches résistantes à la méticilline isolées d'hémocultures (P9, NA8, BCB8)

1 souche sensible à la méticilline isolée d'un liquide articulaire (ANT)

Principe - La technique a été mise au point par d'Hérelle au début des années vingt. Elle permet de mesurer le nombre de particules de phages active contre une souche bactérienne donnée dans un milieu [17].

Les phages sont mis en contact avec une culture de bactéries au sein d'une gélose nutritive semi- molle étalée sur une boîte de Petri. En théorie un phage infecte une bactérie et au terme du cycle infectieux lytique de nombreuses particules virales néoformées sont libérées autour du centre infectieux initial. Les phages néoformés sont capables de diffuser dans la gélose semi-molle et d'infecter les bactéries voisines, qui à leur tour, lors de la lyse, libèrent de nouveau phages. La répétition de proche en proche des cycles infectieux est responsable de la formation progressive d'une petite plage claire exempte de croissance bactérienne

Méthode - La suspension de phages a été diluée en série de raison 10 dans du sérum physiologique. 50 μ L d'une culture bactérienne de 24 h ont été inoculé dans 10 mL de bouillon TS. Le bouillon inoculé à été mélangé à 5 mL de gélose maintenue en surfusion à 50°C, formant la gélose semi-molle. 1,8mL de cette gélose a été additionnée à 200 μ L de chaque dilution de la suspension de phages puis immédiatement étalés à la surface de géloses trypticase soja (TS) coulées en boîte de Petri. Les cultures ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Le nombre de phages (P) de la suspension initiale est donné par la formule suivante :

$$P = (\text{Nombre de plages de lyse} \times 10) / \text{dilution de la suspension}$$

Le titre de phage est exprimé en Unité Formatrice de Plages de lyse par millilitre de la suspension (UFP/mL)

4.2.4 Étude de l'activité lytique en milieu liquide

La mesure de l'activité lytique en milieu liquide permet de mieux appréhender les interactions entre la population de phage et la population bactérienne au cours du temps et en fonction du nombre de particule constitutive de chaque population. Quatre paramètres ont été évalués.

- L'évolution de la lyse bactérienne dans le temps.
- La stabilité de la lyse bactérienne dans le temps.
- L'impact du rapport phage/bactérie sur l'activité bactériolytique.
- Quantification de la réplication des phages au contact des bactéries cible.

4.2.4.1 Évolution de la lyse bactérienne dans le temps

Principe - Nous avons utilisé une méthode similaire à celles qui sont utilisées pour l'étude de la vitesse de bactéricidie d'un antibiotique [128]. La définition de la bactéricidie correspond à une réduction de l'inoculum bactérien initial de plus de 3 Log₁₀ UFC/mL (soit 99,9%) selon les anglo-saxons.

Souches étudiées - L'activité de la suspension en milieu liquide a été mesurée sur les 4 souches cliniques de *S. aureus* (P9, NA8, BCB8, ANT).

Méthode - 0,5mL d'une suspension bactérienne à 10⁷ UFC/mL ont été mélangés à 0,5mL de la suspension de phage à 10⁷ UFP/mL dans 9 mL de BMH, soit un ratio phage/bactérie de 1. Les échantillons ont été placés en agitation au bain-marie à 37°C. A 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24 48 et 72 heures, 50µL de chaque échantillon et de la culture témoin ont été ensemencés à l'aide d'un ensementeur en spirale (Spiral système, Interscience) sur gélose MH. Le dénombrement des bactéries ayant survécu à l'action du phage a été réalisé après 24h d'incubation à 37°C.

4.2.4.2 Impact du ratio phage/bactérie sur l'activité lytique des phages.

Principe - Théoriquement le profil de la lyse bactérienne en milieu liquide va dépendre, du moins en partie, de la probabilité de rencontre entre un phage et une bactérie cible et donc de la densité de particule dans chaque population. Cette probabilité de rencontre suit la **loi statistique de Poisson (Annexe)**. Pour un inoculum bactérien et des conditions expérimentales données la lyse va donc dépendre de la concentration en phage dans le

milieu de culture. Cependant, la concentration de phage permettant d'obtenir une lyse complète peu varier de manière considérable les qualités intrinsèques du bactériophage étudié, voire plutôt du couple phage-bactérie.

L'objectif de cette expérience est donc d'évaluer la qualité de la suspension de phage, en utilisant comme critère l'intensité de la lyse d'un inoculum bactérien fixé pour différentes concentrations de phages.

Souche étudiée – Cette étude a été effectuée sur la souche de *S. aureus* ANT.

Méthode – L'expérience a été réalisée avec la souche *S. aureus* ANT. La méthode de préparation de l'inoculum bactérien a été identique à celle que nous avons utilisée pour l'étude des vitesses de bactéricidie.

Un volume de la suspension de bactériophages à 10^7 UFP/mL, diluée en série de raison 10 jusqu'au 1/1000 en bouillon MH, a été mélangé avec la suspension bactérienne à 10^7 UFC/ml. Le ratio phage/bactérie est appelé « **multiplicity of infection** » ou **MOI** par les anglo-saxons. Les MOI réalisés étaient respectivement de 1 ; 0,1 ; 0,01 et 0,001. Les tubes ont été incubés au bain-marie à 37°C en agitation douce. Des aliquotes de chaque dilution et de la culture témoin (sans phage) ont été prélevés à 0, 2, 6 et 24 heures et ensemencés sur gélose MH à l'aide d'un ensementeur en spirale pour le dénombrement des bactéries ayant survécu à l'action des phages. Les expériences ont été réalisées en triplicata.

4.2.4.3 Multiplication des phages au contact des bactéries.

Principe – Les capacités de multiplication des bactériophages dans les bactéries infectées est à la base de l'intérêt porté à la phagothérapie.

Souche étudiée – Cette étude a été effectuée sur la souche de *S. aureus* ANT.

Méthode – L'évolution du titre de phages au contact des bactéries cibles a été mesurée au cours de l'expérience précédente, pour les différents MOI, à 0, 2, 6 et 24 heures post-infection par la méthode en double couches. La lecture des boîtes a été effectuée après une incubation à 37°C pendant 24h.

4.2.4.4 Essai de sélection d'un phage virulent adapté à *S.aureus* ANT

Hypothèse - La suspension polyclonale contient un grand nombre de clones phagiques plus ou moins spécifique d'une souche de *S. aureus* donnée.

La répétition des cycles infectieux phagiques sur cette souche bactérienne devrait donc sélectionner de la suspension polyclonale un ou des clones de phages plus virulents pour la souche bactérienne étudiée. On parlera de **phage adapté** à la souche bactérienne cible.

Souche étudiée – Cette étude a été effectuée sur la souche de *S. aureus* ANT.

Méthode - La méthode de préparation de l'inoculum bactérien était identique à celle que nous avons utilisée pour l'étude des vitesses de bactéricidie.

Le premier jour, 0,5 mL de la suspension polyclonale de bactériophages à 10^7 UFP/mL ont été mis en contact avec 4,5 mL suspension bactérienne à 10^7 UFC/mL (MOI 1/10). Le tube a été placé au bain-marie à 37°C en agitation douce pendant 6h (jusqu'à lyse complète de l'inoculum bactérien initial). Les débris bactériens ont été éliminés par filtration du phagolysat au travers un filtre stérile de type Millipore de 0,20 μ m. Le titre de phage dans filtrat a ensuite été mesuré par la technique en double couche. La même manipulation a été répétée 10 jours de suite avec le filtrat de phage propagé le jour précédent.

4.2.4.5 Mesure de l'activité lytique du phage adapté à *S. aureus* ANT

Hypothèse - Si un phage ou des phages de plus grande virulence ont été sélectionnés par la technique de propagation sériée, l'activité lytique de ce phage sur la souche bactérienne utilisée pour la propagation est théoriquement supérieure à l'activité lytique de la suspension polyclonale originale.

Méthode - Afin de tester cette hypothèse nous avons reproduit point par point, l'expérience de l'impact du MOI sur l'activité lytique avec la suspension de phages propagés.

4.3 ACTIVITE LYTIQUE DES PHAGES DANS DES CAILLOTS DE FIBRINES INFECTES.

4.3.1 Prérrogatives

De nombreux facteurs peuvent altérer l'efficacité des phages *in vivo* et plusieurs auteurs ont souligné le défaut de corrélation entre activité lytique des phages *in vivo* et *in vitro* [88, 120]. Afin d'évaluer les capacités de diffusion des phages de la suspension et de mesurer leur activité lytique sur *S. aureus* inclus au sein d'un milieu solide et non plus à l'état planctonique dans un environnement liquide, nous avons tenté de construire un modèle de foyer infectieux

ex vivo à partir de caillots de fibrine.

Les caillots de fibrine sont actuellement utilisés par plusieurs équipes pour simuler *in vitro* des végétations d'endocardite infectieuse à *S. aureus* afin d'étudier la diffusion et l'activité des antibiotiques, ceci avec une bonne corrélation avec des modèles animaux [129]

Ce modèle de caillot de fibrine infecté nous a donc paru être un modèle acceptable pour étudier l'activité des bactériophages sur des bactéries à l'état non planctoniques.

4.3.2 Préparation des caillots de fibrine infectés

Des aliquotes de 400 μ L de plasma humain riche en plaquette (PRP) ont été déposées dans des tubes siliconés de type Eppendorf. 50 μ L d'une suspension bactérienne à 10⁷ UFC/mL et 125 μ L de thrombine humaine (500UI/mL), reconstituée dans une solution de chlorure de calcium, ont été ajoutés à chaque aliquote de PRP. Les échantillons ont été placés 30 mn au bain-marie à 37°C. Après formation et rétraction des caillots, ceux-ci ont été extraits des tubes siliconés, rincés trois fois dans du sérum physiologique, séchés dans une compresse stérile, puis pesés.

4.3.3 Détermination de la croissance bactérienne dans les caillots de fibrine

La concentration bactérienne dans les caillots de fibrine et dans le surnageant a été mesurée à 0h, 6h et 24 heures. Chaque caillot infecté a été placé dans 2ml du bouillon MH, sous agitation douce à 37°C. À chaque temps étudié, les caillots ont été rincés, broyés puis homogénéisés dans 500 μ L de sérum physiologique. 50 μ L de chaque homogénat et de chaque surnageant ont étéensemencés et incubés selon les modalités habituelles.

4.3.4 Mesure de l'activité de la suspension de phages dans les caillots de fibrine

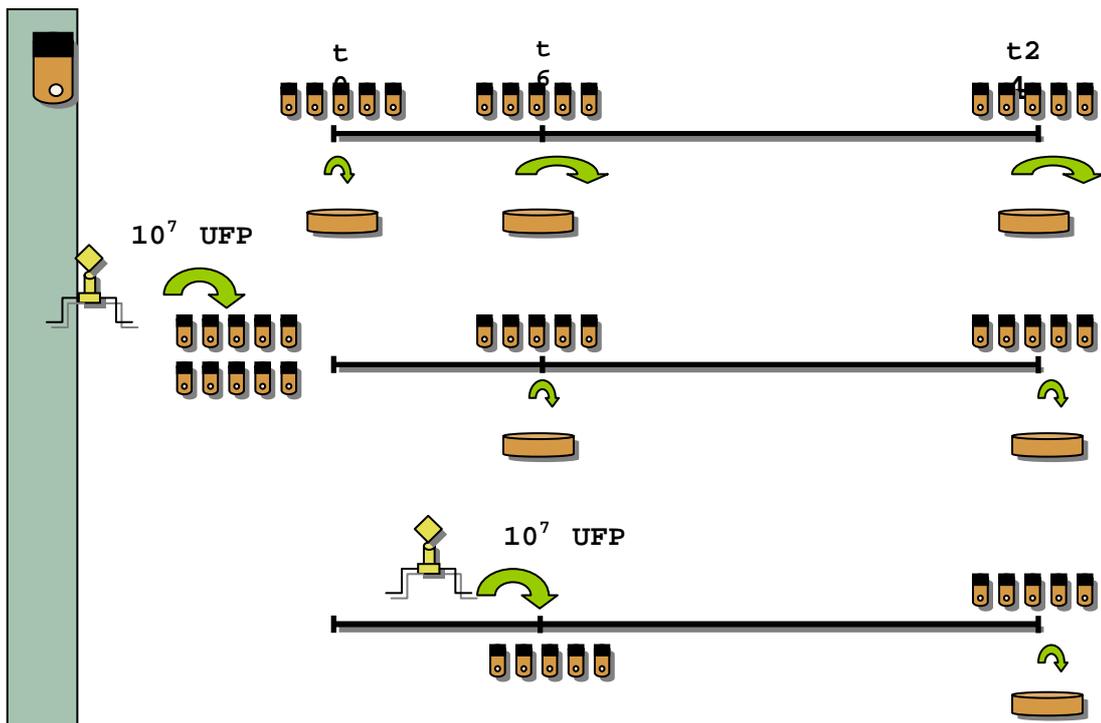
Un lot de caillots de fibrine (n=10) a immédiatement (t 0h) été mis en contact avec 5.10⁶ UFP/mL de phage dans un volume de 2mL de bouillon MH et incubé selon les modalités précédentes. Le dénombrement des bactéries ayant survécu à l'action des phages dans les caillots de fibrine et les surnageants a été réalisé à 6h (n=5) et à 24h (n=5)

Un second lot de caillots de fibrine (n=5) préalablement incubé pendant 6 heures à 37°C a été mis en contact avec le phage à 6h selon les mêmes modalités. Un dénombrement des bactéries survivantes dans les caillots de fibrine et les surnageants a été réalisé à 24h **(figure 7)**.

L'expérience a été réalisée sans et avec agitation.

NB: Pour nous assurer que les concentrations bactériennes mesurées ne reflétaient pas l'activité lytique des phages exercée sur des bactéries remises en suspension après homogénéisation du caillot nous avons réalisé l'expérience suivante: un lot de caillots de fibrines a immédiatement été broyé dans 500µL de suspension de phages pur. L'homogénat a été laissé à température ambiante pendant 20mn puis ensemencé selon les modalités précédentes.

Figure 7 : Schéma du protocole expérimental sur les caillots de caillots de fibrine



4.4 ÉVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA SUSPENSION DE PHAGES *IN VIVO* DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX.

4.4.1 Souches bactériennes et préparation des inocula

3 souches de *S. aureus* sensibles à la suspension de phages *in vitro* ont été utilisées.

2 souches résistantes à la méticilline (SARM): NA8 et P9.

1 souche de sensible à la méticilline (SASM): ANT

Tous les inocula ont été préparés et administrés en bouillon cœur-cervelle (BCC) à partir de la culture bactérienne d'une nuit.

4.4.2 Bactériophages

Le titre de la suspension de phages, mesuré avant chaque expérience par la méthode en double couche était en moyenne de $7 \cdot 10^7 \pm 0,35$ UFP/ml

4.4.3 Antibiotiques

Les antibiotiques ont été préparés et administrés en solution saline à 9%.

La vancomycine (Vancomycine, Merck générique®), a été administré par voie intraveineuse en perfusion continue à débit constant à la dose de 100mg/kg/24h.

La moxifloxacine (Moxifloxacine, Bayer®) a été administrée par voie intraveineuse par l'intermédiaire d'un dispositif contrôlé par informatique simulant les paramètres pharmacocinétiques de la dose usuelle de 400mg/j *per os* chez l'homme.

4.4.4 Modèles expérimentaux

Toutes les expériences ont été réalisées avec des lapins femelles New-zeland, de poids moyen 2,5kg. Les animaux nourris et hydratés *ad libitum* étaient installés dans des cages individuelles ou bien dans des boîtes de contention adaptées pour les expériences nécessitant le maintien prolongé d'une voie veineuse. Les manipulations ont été réalisées sous anesthésie générale obtenue par l'administration intramusculaire de 20 mg/kg de Kétamine. Au décours de chaque expérience, les animaux ont été euthanasié par l'administration intraveineuse létale de 100 mg de thiopental.

Modèle expérimental d'endocardite infectieuse

Le modèle a été décrit par Perlman et Freedman [130].

Principe - L'introduction d'un cathéter en polyéthylène dans le ventricule gauche par voie trans-valvulaire aortique induit une lésion mécanique des valves qui fait le lit de la greffe bactérienne. L'efficacité thérapeutique est jugée sur la mesure de la réduction de l'inoculum bactérien dans les végétations entre le jour de l'initiation et de la fin du traitement.

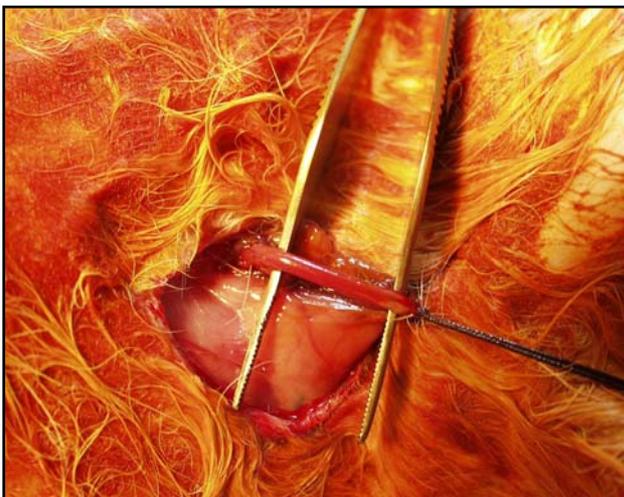
Procédure -

Premier jour: La carotide gauche est abordée par voie para trachéale. Après mise à nu un cathéter y est introduit par voie trans-valvulaire aortique jusqu'au ventricule gauche. La carotide est ensuite fermement ligaturée autour du cathéter qui reste en place. Les plans cutanés sont refermés **(Photo 2)**

Deuxième jour: L'inoculation est réalisée par l'injection dans la veine marginale de l'oreille, de 1ml d'une suspension à 10^8 UFC/mL de la bactérie à étudier. Les animaux sont randomisés dans les différents groupes thérapeutiques.

Troisième jour: les traitements sont initiés et les animaux témoins sont euthanasiés. Les végétations sont recueillies stérilement après cardiectomie, rincées et pesées. Chaque végétation est broyée et homogénéisée dans 500 μ L de sérum salé à 9%. Chaque homogénat est diluée en série de manière appropriée et une aliquote de 50 μ L de chaque dilution estensemencée à l'aide d'un ensemenceur en spirale sur gélose de MH. La lecture est réalisée après 24h d'incubation à 37°C.

Photo 2: Endocardite : Abord carotidien



Protocoles expérimentaux - L'efficacité de la suspension de phage a été évaluée sur les souches de SARM P9 et NA8.

1 mL de la suspension à 10^7 UFP a été administré 1 fois par jour, par voie intraveineuse directe ou en perfusion continue. Le traitement par les phages a été associé ou non avec de la vancomycine. Un groupe témoin sans traitement et un groupe traité par de la vancomycine seule ont servi de comparateurs. La vancomycine a été administrée en perfusion continue à débit constant à la dose de 100mg/kg/24h. Les animaux ont été traités pendant 48 heures (**Tableau III**).

Tableau III. Traitements administrés dans le modèle d'endocardite expérimentale.

Groupes	Traitements	
	SARM P9	SARM NA8
1	Témoins (3)	Témoins (3)
2	Phage 10^7 UFP/j (3)	Phage 10^7 UFP/j (3)
3	Phage 10^7 UFP en continu (3)	nr
4	nr	Phage 10^7 UFP/j + vancomycine (3)
5	Vancomycine (3)	Vancomycine (3)

(n) = nombre d'animaux. nr = non réalisé

Modèle expérimental d'arthrite aiguë du genou

Le modèle a été décrit par Salter [131]

Principe - L'injection d'une suspension bactérienne dans la cavité articulaire du genou chez le lapin est responsable d'une arthrite aiguë en 24 heures dans 100% des cas. L'efficacité du traitement est jugée sur la diminution de la concentration bactérienne dans l'articulation entre le jour de l'initiation du traitement et la fin du traitement.

Procédure

Le premier jour, 1 ml d'une suspension de *S. aureus* ANT à $5 \cdot 10^8$ UFC a été injecté dans la cavité articulaire du genou droit de chaque animal par voie para patellaire interne préalablement rasée et désinfectée par de la polyvidone iodée (**Photo 3**).

Les animaux ont été randomisés dans les différents groupes thérapeutiques.

Le deuxième jour, un échantillon de liquide articulaire a été prélevé par ponction à l'aiguille chez chaque animal. Chaque échantillon a été pesé, homogénéisé, dilué puis ensemencé

sur des géloses MH. En fin de traitement, après euthanasie, le pus à été prélevé par arthrotomie chirurgicale pour la numération des bactéries survivantes.

Photo 3 : Arthrite expérimentale : inoculation bactérienne



Protocole expérimental

Les phages ont été administrés localement 1 fois par jour, seul ou en association avec la moxifloxacine par voie intraveineuse (**Tableau IV**). Un groupe a été traité par la moxifloxacine seule. La moxifloxacine a été administrée par l'intermédiaire d'un dispositif contrôlé par informatique simulant les paramètres pharmacocinétiques d'une dose usuelle de 400 mg/j *per os* chez l'homme. Les animaux ont été traités pendant 4 jours. L'efficacité du traitement a été évaluée par la réduction de la concentration bactérienne moyenne dans les pus à 2 jours et 4 jours de traitement par rapport à la concentration bactérienne mesurée avant le traitement. Les résultats ont été exprimés en Δ Log UFC/g de pus.

Afin de valider le modèle la mesure de la clairance bactérienne spontanée, a été mesurée chez trois animaux non traités

Tableau IV. Différents régimes thérapeutiques dans le modèle d'arthrite à *S. aureus*.

Groupes	Régimes thérapeutiques
6	Non traités (3)
7	Phage 10^7 UFP x 1/j (6)
8	Phage 10^7 UFP x 1/j + Moxifloxacine (6)
9	Moxifloxacine (5)

(n) = nombre d'animaux

4.4.5 Cinétiques des phages

La concentration de phage a été mesurée par la méthode en double couche dans le sang (15mn, 6 heures et 24 heures après injection du phage) et dans les tissus (foie, rate, reins et végétations) 24 heures après la dernière injection, chez un animal du « groupe endocardite » infecté par NA8.

La concentration de phage a été mesurée dans le pus articulaire de quatre animaux, 24 heures après la dernière administration.

4.4.6 Analyses statistiques

L'analyse des résultats a été réalisée par un test de Student après analyse de variance avec le logiciel Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003)

Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative

V RESULTATS

5.1 ACTIVITE *IN VITRO* DE LA SUSPENSION DE PHAGES SUR *S. AUREUS*

Spectre d'activité de la suspension de phages sur *S. aureus*

114 souches parmi les 117 souches testées (97%) étaient complètement sensibles à la suspension de phages, c'est-à-dire avec une absence totale de croissance bactérienne au niveau de la zone de dépôt de la goutte de suspension. 3 souches étaient partiellement sensibles.

La photo 4 montre un exemple un exemple de sensibilité complète et partielle à la suspension par la méthode des spots (**Photo 4**).

Spécificité

Seule une fraction des staphylocoques à coagulase négative était sensible à la suspension de phages testée (**figure 8**).

Les autres souches (Streptocoques, entérocoques, entérobactéries, *Pseudomonas*, *Haemophilus*) étaient résistantes à la suspension de bactériophages.

Titration de la suspension de phages en double couche

Le titre de phage dans la suspension, mesuré sur 4 souches de *S. aureus* était homogène et compris entre 7,2 et 7,7 Log₁₀ UFP/mL (**Tableau V**). La photo 5 représente des plages de lyse en double couche (**Photo 5**).

Tableau V. Concentration de phages de la suspension mesurée sur 4 souches de *S. aureus*.

Souches	Log ₁₀ UFP/mL (moyenne ± écart type)
P9	7,45 ± 0,31
NA8	7,70 ± 0,29
ANT	7,67 ± 0,18
COL	7,29 ± 0,34
Moyenne	7,52 ± 0,17

Photo 4 : Méthode des spots: exemple de sensibilité complète (A) et de sensibilité partielle (B) à la suspension de phage.

Photos 4 : voir thèse papier

Photo 5 : Plages de lyse sur gélose en double couches (flèche)



Figure 8 : Sensibilité des staphylocoques à coagulase négative à la suspension de phages

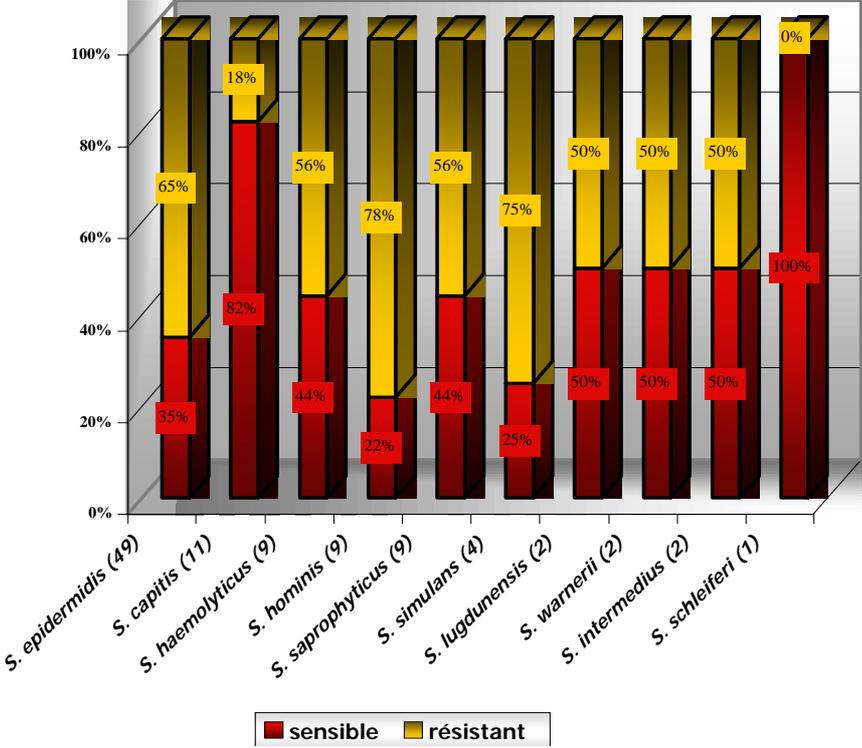
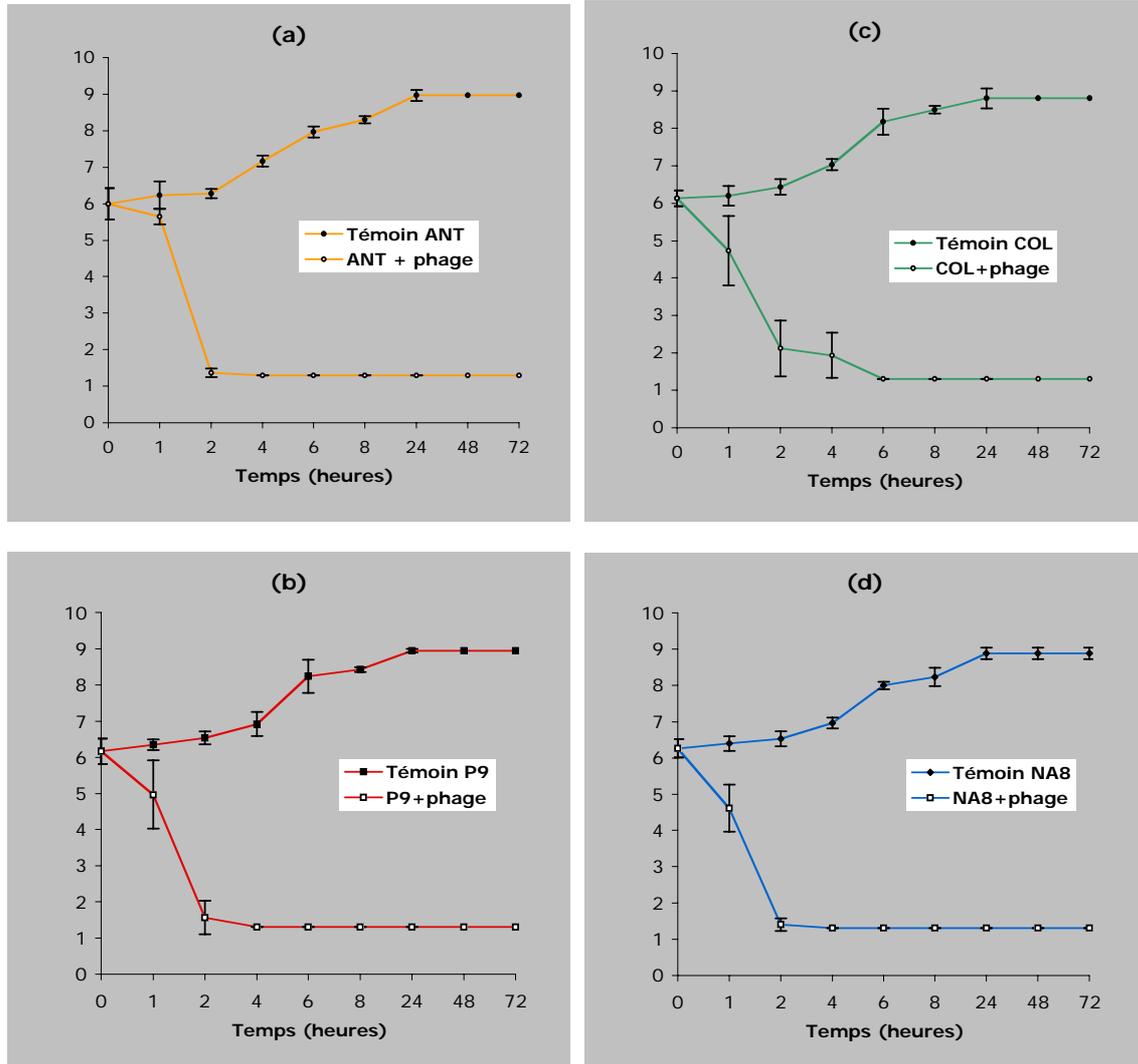


Figure 9 : Vitesse de bactéricidie de la suspension de phages pure sur 4 souches de *S.aureus* (moyennes \pm écart-types de 3 expériences)



Activité lytique en milieu liquide

Sur la figure 9 est représenté le nombre de bactéries survivantes exprimées en \log_{10}

UFC/mL en fonction du temps. Dès 2 heures, la suspension a été bactéricide (réduction de l'inoculum de départ > 3 Log) pour les 4 souches de *S. aureus*. À la 4^{ème} heure la bactéricidie était maximale, aucune bactérie était détectable pour les 4 souches. Aucune recroissance a été observée à 24, 48 et 72 heures (**figure 9**)

Impact du ratio phage/bactérie sur l'activité lytique de la suspension
Les résultats sont représentés sur la figure 10a

- Pour un MOI de 1/1 plus aucune bactérie viable était détectable dès la 2^{ème} heure.
- Pour un MOI de 1/10, le nombre de bactéries viables a initialement augmenté de 1 Log à la deuxième heure. Néanmoins à la 6^{ème} heure une lyse bactérienne complète a été observée (< 10 UFC/mL).
- Pour un MOI de 1/100, une légère réduction de l'inoculum initial a été observé à la 6^{ème} heure (moins 2 Log₁₀ UFC/mL), mais à la 24^{ème} heure la concentration bactérienne était identique à celle du témoin sans phages.
- Pour un MOI de 1/1000 aucune activité lytique n'a été détectée.

Multiplication des phages de la suspension en présence de bactéries

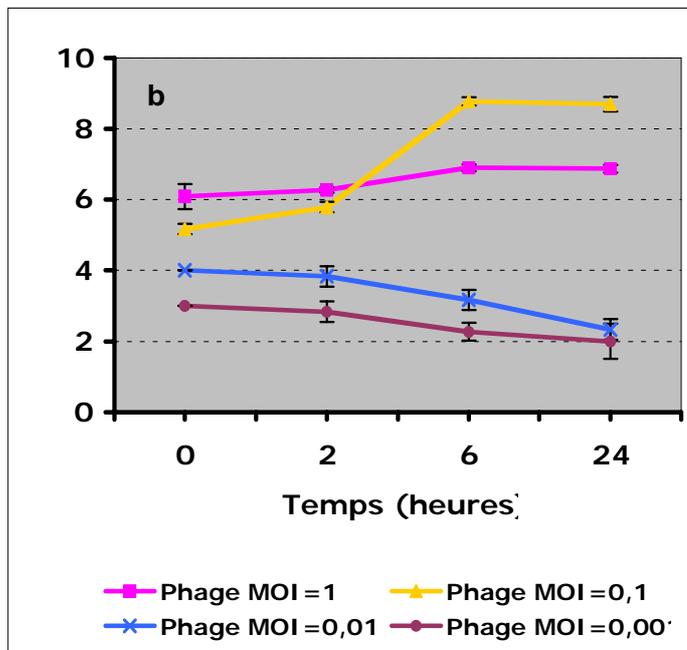
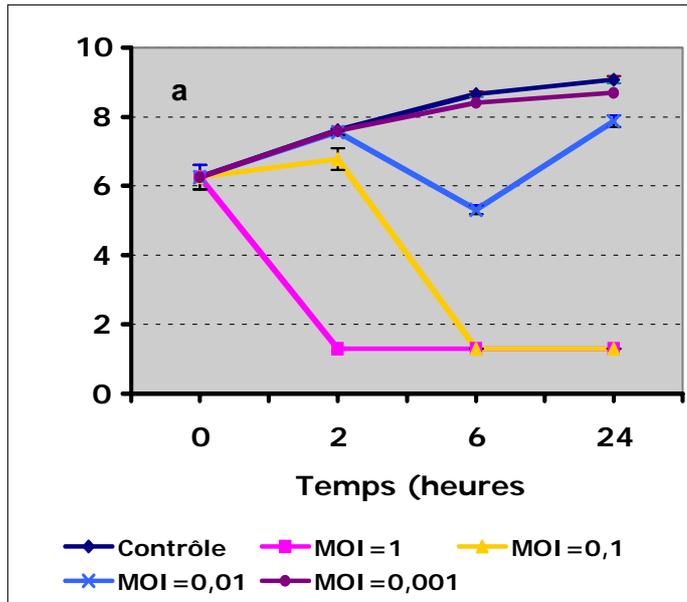
Les résultats sont représentés sur la figure 10b. Le titre de phages est resté sensiblement constant pour un MOI de 1/1. En revanche, pour un MOI de 1/10 on a pu observer une augmentation de la concentration de phage de plus de 3,5 Log₁₀ entre 2 et 6 heures.

Pour les MOI 1/100 et 1/1000 le titre de phage viable a respectivement diminué de 2 et 1 Log UFP/MI

Sélection d'un phage virulent adapté à *S. aureus* ANT

Au terme du 10^{ème} passage le titre de phage de la nouvelle suspension était de 9,5 Log₁₀ UFP/mL

Figure 10 a et b- Activité lytique de la suspension de phage originale sur SA ANT à différents MOI (a) et évolution du titre de phages (b)



Activité lytique du phage adapté sur *S.aureus* ANT
 Les résultats sont présentés sur la **figure 11a**

- À un MOI de 1 plus aucune bactérie viable était détectable dès 2 heures

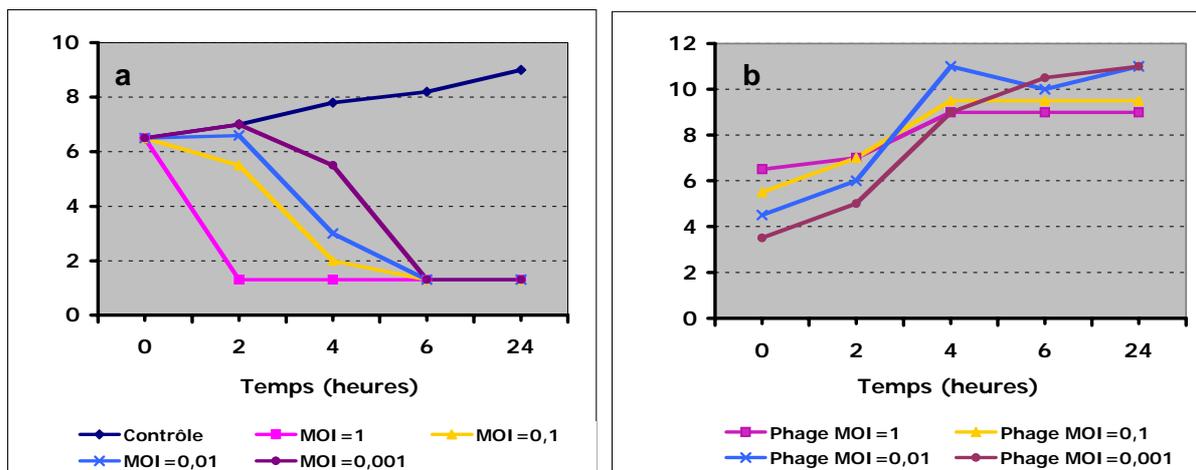
- À un MOI de 0,1 plus aucune bactérie viable était détectable à 4 heures
- Aux MOI de 0,01 et de 0,001 plus aucune bactérie viable était détectable à 6 heures.

Multiplication des phages adaptés en présence de *S.aureus* ANT

Le titre de phage a augmenté à tous les MOI et de manière inversement proportionnelle à leur taille. **(figure 11b)**

- Aux MOI de 1 et 0,1 le titre de phage a augmenté de 3 et 4 Log respectivement.
- Aux MOI de 0,01 et 0,001 le titre de phage a augmenté de 6 et 7 Log respectivement.

Figure 11 a et b- Activité lytique de la suspension de phage adapté à SA ANT à différents MOI (a) et évolution du titre de phages (b)



5.2 ACTIVITE LYTIQUE DES PHAGES DANS LES CAILLOTS DE FIBRINES INFECTES.

Macroscopiquement, les caillots de fibrine obtenus étaient fermes, facilement manipulables. **(Photo 6)**. Le poids moyen était de $16,5 \pm 4,3$ mg.

La photo 7 représente les colonies de *S.aureus* ANT dans un caillot de fibrine en microscopie électronique à balayage **(Photo 7)**



Les concentrations bactériennes dans les caillots exposés ou non aux phages ont été colligées dans le tableau VI et la figure 12a et ont été exprimées en Log_{10} UFC par gramme de fibrine \pm écart-type (**Tableau VI, figure 12a**). La diminution de la concentration bactérienne initiale a été d'environ 3 Log lorsque les caillots de fibrine ont été immédiatement exposés aux phages et seulement de 1,5 Log lorsque les caillots ont été exposés aux phages 6 heures après inoculation.

Une croissance bactérienne est détectable dans les surnageants des caillots témoins ($3,3 \pm 0,8$ Log UFC/mL à 6 h, $8,9 \pm 0,15$ UFC/mL à 24 h). En revanche les surnageants des caillots exposés aux phages sont restés stériles (**figure 12b**)

Sans agitation des échantillons, l'activité lytique des phages a été nulle. Les résultats de l'effet de l'agitation des échantillons sont présentés sur la **figure 13**.

Figure 12. Activité de la suspension de phage dans les caillots de fibrines (a) et dans les surnageants (b) (o = caillot de fibrine. Barre horizontale = médiane)

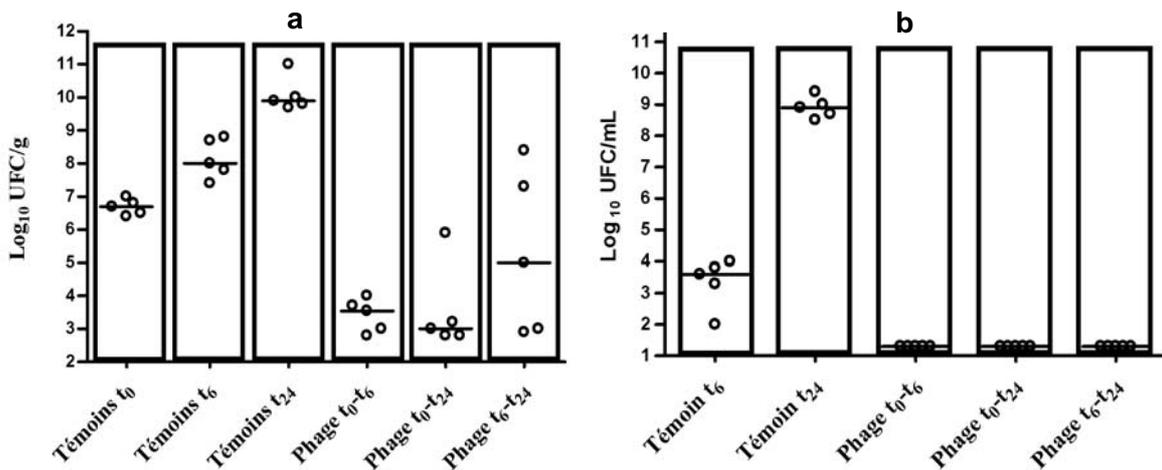
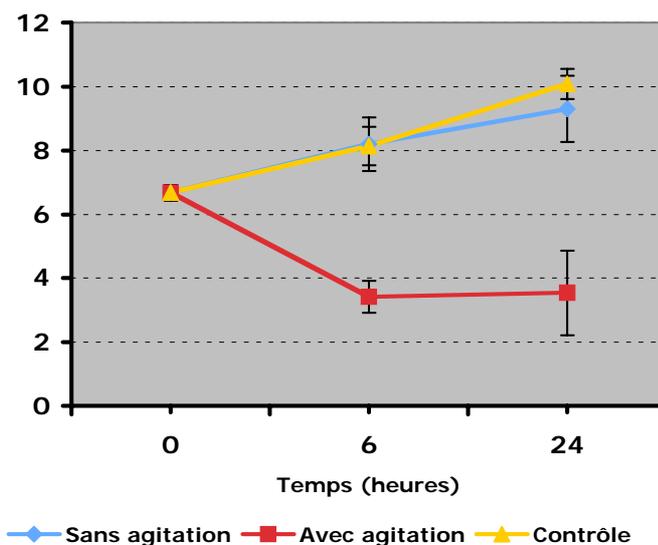


Tableau VI. Concentration bactérienne moyenne dans les caillots de fibrine exposés ou non à la suspension de phages.

Groupes	Type d'échantillon (n)	Log ₁₀ UFC /g ± écart type
A	Témoin t 0h (5)	6,7 ± 0,24
B	Témoin t 6h (5)	8,2 ± 0,26
C	Témoin t 24h (5)	10 ± 0,53
D	Phage t 0-6h (5)	3,4 ± 0,5 ^{a, b}
E	Phage t 0-24 h (5)	3,5 ± 1,3 ^{a, c}
F	Phage t 6-24 h (5)	5,3 ± 2,5 ^{d, c}

n = nombre de caillots de fibrine. a : p < 0,01 vs groupe A, b : p < 0,001 vs groupe B, c : p < 0,001 vs groupe C, d : p < 0,05 vs groupe D. Analyses statistiques : test de Student après analyse de variance

Figure 13. Activité comparée de la suspension de phages dans les caillots de fibrine agités et non agités (moyennes ± écart-types)



5.3 ÉVALUATION DE L'ACTIVITE DE LA SUSPENSION DE PHAGES *IN VIVO*.

Endocardite aortique à *S. aureus*.

Les résultats sont reportés dans le tableau VII et sur la figure 14. Les bactéries survivantes

dans les végétations sont exprimées en Log_{10} UFC/g. Chez les animaux infectés par SARM P9 et traités par la suspension de phages, on a observé une réduction de l'inoculum bactérien d'environ 2,5 Log UFC/mL cependant cette différence n'était pas statistiquement significative compte tenu du petit nombre d'animaux. En revanche, chez ces animaux, la vancomycine a été bactéricide dès 48 heures de traitement.

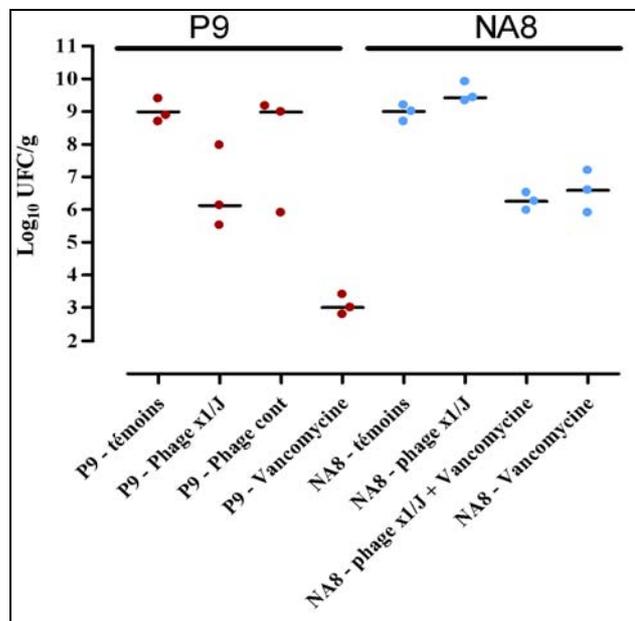
Dans le groupe d'animaux infectés par NA8 la réduction de l'inoculum bactérien a été similaire dans le groupe d'animaux traités par la vancomycine associée au phage et le groupe traité par vancomycine seule.

Tableau VII : Etude de l'activité *in vivo* de la suspension de phages sur les souches *S. aureus* P9 et NA8 dans le modèle d'endocardite.

Traitements (n)	Log_{10} UFC/g (moyenne \pm écart type)	
	SARM P9	SARM NA8
Témoins (3)	$9 \pm 0,36$	$8,95 \pm 0,25$
Phage 10^7 UFP/j (3)	$6,55 \pm 1,28$	$9,5 \pm 0,3$
Phage 10^7 UFP en continu	$8 \pm 1,8$	nr
Phage 10^7 UFP/j + Vancomycine (3)	nr	$6,25 \pm 0,27$
Vancomycine (3)	$3 \pm 0,3$	$6,55 \pm 0,65$

(n) = nombre d'animaux. nr = non réalisé

Figure 14 : Efficacité de la suspension de phage par voie intraveineuse et de la vancomycine sur 2 souches de *S. aureus* dans le modèle d'endocardite aortique.



Arthrite aiguë à *S. aureus*.

Chez les animaux non traités, la réduction de la concentration bactérienne initiale liée à la clairance naturelle (immunité non spécifique) était non significative (- 0,8 Log UFC/g à 2 jours et de -1,3 Log UFC/g à 4 jours)

Chez les animaux traités par la suspension de phages une fois par jour, on a observé une diminution de la concentration bactérienne dans le liquide synovial à 2 jours (-1,25 Log

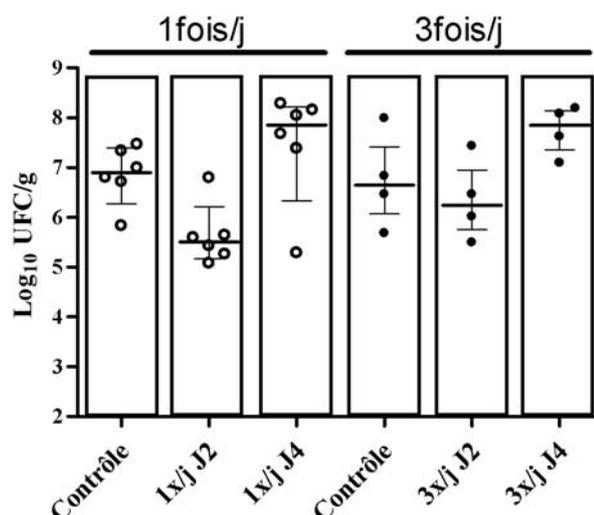
UFC/g, $p = 0,01$) cependant cette différence n'a pas été retrouvée après 5 jours de traitement. Chez les animaux traités par la moxifloxacine seule, les ΔLog étaient comparables à ceux qui ont été observés dans le groupe traité par l'association phage et antibiotiques (**Tableau VIII et figure 15**). En 2 jours, tous les régimes thérapeutiques ont été comparables en termes d'efficacité. En 4 jours, seuls les traitements par la moxifloxacine, seule et en association avec la suspension de phages étaient efficaces. Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre ces 2 derniers régimes thérapeutiques.

Tableau VIII : Activité *in vivo* de la suspension de phage sur *S. aureus* ANT dans le modèle d'arthrite.

Temps de prélèvement des pus	2 jours	4 jours
Traitements (n)	ΔLog_{10} UFC /g	
Phage x 1/j (6)	- 1,25	+ 0,6
Phage x 1/j + moxifloxacine (6)	- 1,5	- 3 ^a
Moxifloxacine (6)	- 1,65	- 2,3 ^a
Phage x 3/j (4)	- 0,4	+ 0,7

n = nombre d'animaux. $p < 0,001$ a vs phage seul . Analyse statistique : Test de Student après analyse de variance.

Figure 14: Efficacité de la suspension de phage par voie intra-articulaire sur SA ANT dans le modèle d'arthrite aiguë. En 1 ou 3 administrations/j, à 2 et 4 jours de traitement



Cinétique et distribution des phages dans l'organisme des animaux.

Des phages ont été retrouvés à faible concentration dans les tissus où ils ont été recherchés 24 heures après l'administration intraveineuse de 5.10^7 UFP et en particulier dans les végétations infectées par *S. aureus* (**Tableau IX**). 99% des phages ont disparu de la circulation sanguine 15 minutes après l'administration intraveineuse et moins de 99,9% après 24 heures (**Tableau X**). 24 heures après la dernière injection, plus de 99,99% des phages initialement administrés dans la cavité articulaire ne sont plus détectés ($3,95 \pm 0,7$ Log UFP/mL).

Tableau IX : Concentration de phages dans différents tissus 24 heures après l'injection intraveineuse de 5.10^7 UFP.

Tissus	Log₁₀UFP/g de tissu
Végétations	3,2
Rate	2,2
Foie	2,3
Rein	2

Tableau X : Cinétique plasmatique des phages après une injection intraveineuse de 5.10^7 UFP.

Temps	Log₁₀UFP/mL de sang
15mn	3
6h	3,1
24h	2,3

VI DISCUSSION.

La première partie de notre travail a évalué l'activité lytique *in vitro* de la suspension de phages anti-staphylococciques à usage thérapeutique, commercialisée en Russie. Certaines caractéristiques de la suspension de phages avaient déjà été étudiées dans un travail de thèse dirigé par Dublanche en 2004 [132]. La comparaison des spectres d'hôte de plusieurs phages isolés de la suspension, avait permis de mettre en évidence son caractère polyclonal. L'utilisation de suspensions polyclonales en phagothérapie permet d'élargir le spectre d'hôte et donc théoriquement de limiter l'émergence de mutants résistants au sein d'un isolat bactérien [62, 115]. Nous avons montré par la méthode des spots que la

suspension était spécifique de l'espèce *Staphylococcus aureus*, même si quelques souches de staphylocoques à coagulase négative y étaient sensibles, probablement en raison de la présence de récepteurs de paroi communs aux deux espèces. Le spectre d'hôte de la suspension était large au sein de l'espèce *S. aureus*. Cent quatorze souches cliniques de *S. aureus*, de phénotypes variés (97% des souches testées) étaient sensibles à la suspension de phages. Le simple spot test n'est cependant pas suffisant pour évaluer l'efficacité réelle d'un phage sur une bactérie. Même si la reconnaissance des récepteurs à la surface de la paroi bactérienne par les adhésines des phages demeure spécifique, la lyse bactérienne, par cette technique, ne met pas en jeu le cycle infectieux à proprement parler. Celle-ci provient de la désorganisation structurale de la paroi bactérienne liée à la fixation d'un grand nombre de phages à sa surface. Ce phénomène est appelé « *lysis from without* » [17, 101].

La formation de plages de lyse par la méthode en double couche, signifie en revanche que les phages sont capables de se multiplier au contact des bactéries cibles. Cette méthode est cependant un mauvais reflet de la virulence des phages étudiés, car la production de 10 à 15 virions par bactérie infectée (« burst size »), est suffisante pour obtenir la formation d'une plage de lyse [17]. Raynaud *et al*, qui concluent à l'échec de la phagothérapie dans un modèle d'entérite à *E. coli* chez le lapin, ont utilisé ces techniques pour évaluer la virulence de leurs phages [133]. Les résultats négatifs de cette étude doivent donc être sujet à caution. La plupart des travaux expérimentaux récents étudiant la phagothérapie dans des modèles animaux évaluent l'activité lytique *in vitro* des phages utilisés, par des méthodes optiques, indirectes, mesurant la clarification d'un bouillon de culture de la bactérie cible par les bactériophages. Dans ces études, l'évaluation de la lyse bactérienne va, de l'observation à l'œil nu à la mesure de la densité optique par spectrophotométrie [95, 99-101, 111, 134, 135]. Cependant, le seuil de détection de ces méthodes qui est de 10^6 UFC/mL est peu discriminant et évalue mal la bactéricidie [128]. L'évaluation de l'activité d'un phage par cette technique peut conduire à des échecs thérapeutiques par sélection d'un phage insuffisamment virulent [95]. À notre avis, puisqu'il existe des phages capables de stériliser complètement, même à faible concentration, une culture de bactéries en milieu liquide [86], la mesure, par méthode microbiologique, du nombre de bactéries survivant à l'action des phages est un meilleur reflet de l'activité lytique. Seuls quelques auteurs, dont Smith et Huggins dans leurs travaux princeps ont utilisé cette méthode d'évaluation de l'activité lytique des phages [86, 136]. Nous avons évalué l'activité *in vitro* de notre suspension de phages par une technique standardisée et validée pour l'étude des vitesses de bactéricidie des antibiotiques [128].

Nous avons montré que notre suspension était bactéricide sur les quatre souches de *S. aureus* étudiées dès deux heures et qu'une bactéricidie intense était observée dès quatre heures, avec une lyse complète de l'inoculum initial. L'activité bactéricide *in vitro* de la

suspension de phages était supérieure à celle d'antibiotiques parmi les plus bactéricides sur *S.aureus* que sont les aminosides.

L'action du phage sur la bactérie cible découle du contact ou non entre ces deux particules, dont la répartition dans un milieu liquide est particulière car elle suit une loi de Poisson **(Annexe)** [17, 121]. Cette distribution particulière est importante à connaître pour interpréter les variations d'activité de la suspension en fonction de la concentration de phages (MOI). *In vitro*, nous avons montré que pour un MOI de 1, la suspension était rapidement bactéricide ; En effet à ce MOI, 90% des bactéries sont infectées par un phage au décours de la période d'adsorption selon la loi de Poisson. Pour un MOI de 1/10, la bactéricidie a été retardée. Dans ce cas, seulement 10% des bactéries sont infectées par un phage au décours de la période d'adsorption. Ceci explique probablement l'aspect initial de la courbe qui montre un ralentissement apparent de la croissance bactérienne.

On observe pour un MOI de 1 que le titre de phages reste apparemment constant dans le temps. La lyse est donc le reflet de la mise en jeu d'un cycle infectieux et non la manifestation d'un phénomène de « lysis from without », sinon la concentration de phages, sans multiplication, aurait significativement diminué, par inactivation des phages adsorbés à la surface des bactéries. L'absence d'augmentation du titre de phages peut être expliquée, d'une part par le faible nombre de cycles réplicatifs mis en jeu à ce MOI, car les bactéries ont été rapidement détruites et peut être par l'inactivation d'un certain nombre de phages viables adsorbés aux débris bactériens issus de la lyse initiale ; L'effet net aboutissant à un équilibre entre phages produits et phages inactivés. Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en mesurant la concentration de phages de la suspension, avant et après mise en contact avec des débris bactériens produits par sonication par exemple. Cette observation est importante car elle peut expliquer, si les phages sont inactivés par certaines substances inertes, comme le souligne Weld *et al* [120], l'échec de la phagothérapie dans certains travaux expérimentaux [107, 135]. Pour un MOI de 1/10 la concentration de phages a significativement augmenté, probablement car le nombre de cycles infectieux pour aboutir à la stérilisation de la culture bactérienne a été plus important. De plus, il est possible que la répétition des cycles infectieux ait sélectionné un phage plus virulent parmi les clones de la suspension (avec un temps d'adsorption plus court et/ou un *burst size* plus important) ce qui pourrait expliquer l'augmentation considérable du titre de phages après quatre heures. Pour des MOI de 1/100 et de 1/1000 les phages ont été inefficaces en termes de lyse bactérienne. En effet, statistiquement, moins de 1% des bactéries ont été initialement infectées par un phage. Il est donc possible que les bactéries soient entrées en phase stationnaire et/ou que les conditions physicochimiques du milieu de culture soit devenues défavorables [2] à l'infection phagique avant que la multiplication des phages ne devienne apparente. Cependant bien que certains auteurs aient souligné que l'infection d'une bactérie par un phage n'était possible que si la bactérie était en phase de croissance, des études plus

récentes ont montré que des phages pouvaient être actifs sur les bactéries en phase stationnaire [101, 137].

Ces constatations sont importantes car elle sous-entendent, au moins dans notre modèle, que des concentrations de phages élevées doivent être utilisées *in vivo* dans nos modèles expérimentaux pour augmenter les chances de succès thérapeutique. Soothill a montré dans un modèle murin d'infection létale inoculé avec *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, que le MOI minimal capable de lyser 10^5 UFC de bactéries *in vitro* était respectivement de 1/10000, 1/1000 et 10 et était inversement corrélé aux chances de succès thérapeutique. Un MOI de $1/10^6$ a permis d'obtenir un succès thérapeutique dans le groupe d'animaux infectés par *A.baumannii*, l'étude avec *S.aureus* a échoué [95]. Le MOI minimal pour lyser une culture bactérienne *in vitro et in vivo* est donc une donnée qui peut varier sensiblement selon le couple bactérie-phage étudié et qui nous semble intéressante à considérer comme marqueur d'activité lytique d'un phage donné.

Bull et Levin ont montré que l'on pouvait mieux prédire la virulence *in vivo* de certains phages en mesurant leur capacité répliquative *in vitro* dans le sérum de l'animal étudié [88].

En conséquence ces auteurs soulignent l'importance de développer des modèles intermédiaires, simulant les situations *in vivo*, afin de sélectionner les phages les plus virulents dans ces conditions.

Nous avons développé pour le laboratoire, un modèle *in vitro* de site infectieux avec des caillots de fibrine infectés par *S.aureus*. Ce modèle est utilisé comme modèle d'endocardite *in vitro* par certains auteurs. Nous avons montré que les phages pouvaient diffuser au sein du réseau de fibrine pour atteindre leur cible bactérienne, mais seulement sous certaines conditions. En effet, en l'absence d'agitation du milieu dans lequel phages et caillots de fibrine étaient mis en contact, aucune activité lytique n'était constatée. Sans agitation, les caillots de fibrine reposaient au fond du tube contenant la suspension de phages. Il est probable que l'agitation ait optimisé les contacts entre phages et bactéries en permettant la mobilisation des caillots de fibrine dans la suspension de phages. De plus, l'activité lytique de la suspension de phages était inférieure à l'activité en milieu liquide quel que soit le délai de mise en contact. Il est difficile de dire si cette diminution d'activité était liée à des paramètres purement physiques de diffusion ou à des modifications du statut métabolique de la bactérie dans les caillots. Dans la littérature, les études concernant les capacités de diffusion des phages dans les organismes vivants ou dans des milieux particuliers sont assez contradictoires. Plusieurs études expérimentales ont bien montré que les phages pouvaient être efficaces pour traiter des infections situées à distance du site où ils étaient administrés chez l'animal et diffuser dans nombre de tissus de l'organisme, mais aussi, comme l'ont montré certains modèles *in vitro*, de pénétrer dans des substance inertes comme les biofilms ou dans le tissu sous-cutané [86, 98, 123, 138]. D'autres auteurs ont

cependant montré, dans des modèles *ex vivo* d'entérite à *E.coli*, que les bactéries pouvaient être protégées de l'action des phages par le mucus intestinal [111, 120].

Bien que la suspension de phages se soit révélée être particulièrement active *in vitro* sur les germes étudiés, elle a été totalement inefficace dans nos deux modèles d'infection expérimentale *in vivo*. Nos résultats sont en contradiction avec les résultats spectaculaires rapportés par les études chez l'Homme, en particulier polonaises, dans les infections à *S.aureus*, parfois sévères. En revanche les études expérimentales évaluant l'efficacité de la phagothérapie dans les infections à *S.aureus* sont rares. La seule étude récente ayant montré une efficacité thérapeutique est celle de Matsuzaki *et al* qui ont utilisé un phage anti-staphylocoque doré adapté et virulent [101]. Cependant, comme dans beaucoup de travaux récents, il s'agit d'un modèle murin de péritonite-sepsis, éloigné des conditions cliniques. Cette étude montre cependant que le phage prévient le décès de 100% de souris jusqu'à un MOI de 1 lorsqu'il est administré par voie intra-péritonéale au même moment que l'inoculum bactérien. Soothill *et al* ont échoué sur le même modèle en 1992 avec un phage provenant de la collection de Slopeck et utilisé en thérapie humaine, manifestement pour des problèmes de virulence et de dose [95]. En 2005, Wills *et al* ont montré dans un modèle d'abcès à *S. aureus* chez le lapin, que leur phage adapté, isolé d'eaux usées, était capable de prévenir la formation des abcès lorsqu'il était administré au même site et au même moment à une intensité proportionnelle à la dose de phages administrée, jusqu'à un MOI de 1/100 [135]. En traitement retardé de 6 heures, il n'y avait plus d'effet. Cependant l'étude ne mentionne pas clairement comment l'activité lytique *in vivo* a été évaluée. Encore plus récemment, une étude de Gill *et al* décrit l'échec de la phagothérapie dans le traitement de mastites à *S. aureus* chez des vaches [107]. Là encore, l'étude de l'activité *in vitro* du phage utilisé n'est pas clairement mentionnée.

Dans notre modèle d'endocardite, des phages ont été mis en évidence à faible concentration dans la circulation sanguine et les végétations d'animaux infectés. Cependant, la quantité de phages administrée était probablement beaucoup trop faible pour espérer atteindre un MOI au moins égal à 1/10 au sein des végétations cardiaques (où le nombre de bactéries est environ de 10^7 UFC), compte tenu de la dilution rapide des phages dans le volume sanguin des animaux. De plus, nous avons montré que les phages étaient moins actifs au sein des caillots de fibrine pour des raisons de diffusion ou de statut métabolique bactérien (phase stationnaire). Or on sait que les bactéries dans les végétations d'une endocardite infectieuse sont en phase stationnaire. Dans notre étude, nous avons mis en évidence des phages dans la rate et le foie d'animaux infectés. Plusieurs auteurs ont montré que les phages étaient rapidement éliminés par le système réticulo-endothélial d'animaux non infectés [92, 123]. Raynaud *et al* ont aussi montré, dans un modèle d'entérite à *E. coli* chez le lapin, traitée par

par voie parentérale, que le pool de phages viables disponibles était diminué par leur adsorption à la surface des cellules sanguines. Ces facteurs ont probablement contribué à rapidement diminuer le nombre de phages disponibles pour traiter l'infection chez nos lapins. Dans notre modèle d'arthrite, les phages ont été administrés dans la cavité articulaire, directement au contact des bactéries 24h après l'inoculation bactérienne. Des phages à faible concentration ont été retrouvés dans le pus articulaire en fin de traitement, 24 heures après la dernière administration (résultats non rapportés). Il est possible qu'une grande partie des phages administrés ait été inactivée par leur adsorption aux débris bactériens, ou aux cellules de l'immunité non spécifique présents dans le pus. De plus, au sein du pus d'arthrite, les conditions d'anaérobiose, en diminuant la croissance bactérienne et en augmentant l'acidification [2] du milieu ont pu contribuer à la diminution de l'activité des phages *in vivo*.

L'échec des expériences *in vivo* pourrait aussi être lié à la qualité de la suspension de phages utilisée. D'une part, comme nous l'avons vu, la concentration de phages était probablement trop faible compte tenu de la densité bactérienne importante dans les foyers infectieux et d'un objectif de MOI minimal de 1/10.

D'autre part nous avons utilisé une suspension de phages polyclonale dont le titre ne reflète pas le titre du phage le plus actif dans la suspension ; Et effectivement, nous avons récemment isolé un clone spécifique, à concentration élevée, d'une des bactéries étudiées, qui est 10 à 100 fois plus actif que la suspension polyclonale initiale, à la même concentration. Ce résultat encourageant nous a conduit à reprendre nos manipulations avec ce nouveau matériel. Celles-ci sont actuellement en cours.

VII Conclusion et perspectives

Comme beaucoup d'auteurs l'ont signalé, l'absence de corrélation simple entre activité des phages *in vitro* et *in vivo* rend difficile l'évaluation de la phagothérapie dans les modèles expérimentaux, en particulier dans le choix du phage à utiliser. Les équipes qui ont essayé de modéliser mathématiquement les interactions phage-bactérie dans un organisme vivant ne font que souligner leur complexité [115, 118, 119]. Cependant, leur utilisation extensive dans les « Pays de l'Est », les résultats positifs des travaux expérimentaux récents en Occident et les avantages théoriques de la phagothérapie (réplication au contact de la bactérie au niveau du site infectieux, probable inocuité, avantage en termes d'écologie bactérienne en raison du spectre d'hôte étroit) en font une thérapeutique antibactérienne séduisante.

Malgré l'échec thérapeutique dans nos modèles animaux, nous pensons que la phagothérapie doit continuer à être évaluée, car beaucoup de points dans notre étude sont critiquables, en particulier l'utilisation d'une concentration de phages trop faible compte tenu des conditions expérimentales. Une meilleure caractérisation des phages thérapeutiques et le développement de modèles plus opérants pour l'évaluation de l'activité *in vitro* pourrait permettre de mieux approcher les interactions entre phages et bactéries dans des milieux plus complexes qu'un tube à essai. La phagothérapie ne remplacera évidemment jamais l'antibiothérapie conventionnelle. Une des raisons évidentes est que son utilisation nécessite la connaissance de la bactérie en cause dans l'infection à traiter. Cependant, son utilisation est en passe d'être réévaluée chez l'Homme dans le traitement à grande échelle du Choléra. Elle pourrait aussi être envisagée comme adjuvant, voire comme alternative, dans des cas particuliers d'infections, en impasse thérapeutique. Par exemple dans des infections chroniques ostéo-articulaires ou cutanées à staphylocoque ou à *pseudomonas* multirésistants. Ce sont d'ailleurs majoritairement ce type d'infections qui sont traitées dans les centres de phagothérapie en Géorgie et en Pologne.

Un de nos projets dans le laboratoire est justement d'évaluer le phage « virulent » que nous avons isolé, dans un modèle d'ostéomyélite chronique chez le lapin après l'avoir testé *in vitro* dans les caillots de fibrine.

Références bibliographiques

- [1] Hankin EH. L'action bactéricide des eaux de la Jumma et du Gange sur le vibron du choléra. Ann de l'Inst Pasteur. 1886;10:511-23.
- [2] Guttman B, Raya R, Kutter E. Basic Phage Biology. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophage: biology and application*. Boca Raton: CRC Press 2005:29-66.
- [3] Ackermann HW. Bacteriophage: observations and evolution. Res Microbiol. 2003;154:245-51.
- [4] Ackerman HW. Bacteriophage classification. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophage: biology and application*. Boca Raton: CRC Press 2005:67-89.
- [5] Bradley DE. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. J Bacteriol. 1967;31:230-314.
- [6] Campbell A. The future of bacteriophage biology. Nat Rev Genet. 2003;4:471-77.
- [7] Ackermann HW, Eisenstark A. The present state of phage taxonomy. Intervirology,. 1974;3:201-19.
- [8] Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Archives of Virology. 2001;146:843-57.
- [9] Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. Advances in Virus Research. 1999;51:135-201.
- [10] D'Herelle F. Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). Compt Rend Soc de Biol. 1917;81:1160-62.
- [11] Lwoff A, Horne RW, Tournier P. A system of viruses. Cold Spring Harbour Symp. Quant Biol. 1962;27:1-62.
- [12] Van regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL *et al*. Virus Taxonomy, seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego; 2000.
- [13] Gupta K, Lee Y, Yin J. Extremo-phage: In vitro selection of tolerance to a hostile environment. J Mol Evol. 1995;41:113-14.
- [14] Brüssow H, Kutter E. Phage Ecology. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophage: biology and application*. Boca Raton: CRC Press 2005.
- [15] Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microb. 2004;28:127-81.
- [16] Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brussow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. J Bacteriol. 2004;12:3677-86.
- [17] Carlson K. Working with bacteriophage: common techniques and methodological approaches. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophage: biology and application*. Boca Raton: CRC Press 2005.
- [18] Hendrix RW, Smith MC, Burns RN *et al*. Evolutionary relationships among diverse

- bacteriophages and prophages: all the world's phage. Proc Natl Acad Sci USA, . 1999;96:2192-97.
- [19] Young R, Wang I, Roof W. Phage will out: strategies of host cell lysis. Trends Microbiol. 2000;8:121-28.
- [20] Kutter E, Raya P, Carlson K. Molecular mechanism of phage infection. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. *Bacteriophage: biology and application*. Boca Raton: CRC Press 2005.
- [21] Campbell A. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. J Bacteriol. 1992;174:7485-99.
- [22] Wang I, Smith D, Young R. Holins: The protein clocks of bacteriophage infections. Annu Rev Microbiol. 2000;54:799-825.
- [23] Bernhardt TG, Wang I, Young R et al. A protein antibiotic in the phage Qb virion: diversity in lysis targets. Science. 2001;292:2326-29.
- [24] Bernhardt T, Wang I, Young R. Breaking free: "proteins antibiotics" and phage lysis. Res Microbiol. 2002;153:493-501.
- [25] Fischetti V. The use of phage lytic enzymes to control bacterial infections. In: Kutter E, Sulakvelidze A, ed. *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton: CRC Press 2005:321-34.
- [26] Ellis E, Delbrück M. The growth of bacteriophages. J Gen Physiol. 1938;22:365-84.
- [27] Tword FW. An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. The Lancet. 1915;2:27-29
- [28] D'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Compt Rend Acad Sci Ser D. 1917;165:373-75.
- [29] D'Herelle F. Le bactériophage: Son rôle dans l'immunité. Presse Méd. 1921;29:463-64.
- [30] Summers WC. Bacteriophage therapy. Annu Rev Microbiol. 2001;55:437-51.
- [31] Summers WC. Bacteriophage research: early history. In: Kutter E, Sulakvelidze A, ed. *Bacteriophages:biology and applications*. Boca Raton: CRC Press 2005:1-27.
- [32] Bordet J, Ciuca M. Remarques sur l'historique de recherches concernant la lyse microbienne transmissible. Compt Rend Soc de Biol. 1921;84:745-47.
- [33] Hetler DM, Bronfenbrenner J. Further studies on mechanism of transmissible lysis of bacteria. Proc Soc Exper Biol Med. 1932;29:806-8.
- [34] Bronfenbrenner JJ, Sulkin E. Effect of bacteriophage in experimental staphylococcal septicemia in rabbits. J Bacteriol. 1941;41:61-4.
- [35] Bronfenbrenner JJ, Sulkin E. Bacteriophage therapy. On the nature of the deleterious effect of the local application of *Staphylococcus* bacteriophage. J Infect Dis. 1939;65:64-70.
- [36] Bronfenbrenner JJ, Sulkin E. Bacteriophage therapy. Prophylactic and therapeutic effect of bacteriophage and of antiviral in experimental infections of the eye. J Infect Dis. 1939:58-63.

- [37] Bronfenbrenner JJ. Filterables viruses. Baltimore: Williams and Wilkins 1928.
- [38] Kabeshima T. Sur un ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité intestinale, de la nature du « dit microbe filtrant bactériophage de D'Herelle » Compt Rend Soc de Biol. 1920;83:219-21.
- [39] D'Herelle F, Smith GH. The Bacteriophage and its Clinical Application. Springfield, Illinois Charles C. Thomas, Inc 1930.
- [40] D'Herelle F. Le microbe bactériophage, agent d'immunité dans la peste et la barbone. Compt Rend Acad Sci Ser D. 1921;1972.
- [41] D'Herelle F. Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. Presse Med. 1925;33:1393-4.
- [42] D'Herelle F. Le choléra asiatique. Presse Med. 1928;36:961-64.
- [43] Morison J. Bacteriophage in the Treatment and Prevention of Cholera. London: H.K. Lewis 1932.
- [44] Dublanchet A. La vraie vie de Félix D'Herelle avant la découverte du bactériophage. . Assoc Anc Elèv Inst Pasteur, . 2003;175:80-2.
- [45] Gratia A. La lyse transmissible du staphylocoque: sa production et ses applications thérapeutiques. Compt Rend Soc de Biol. 1922;86:276-78.
- [46] Beckerich A, Hauduroy P. La bactériophagie et ses applications thérapeutiques. J Bacteriol. 1923;3:163-71.
- [47] Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage. Compt Rend Soc de Biol. 1921;85:1120-21.
- [48] Eaton MD, Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (I). J Am Med Assoc. 1934;103:1769-76.
- [49] Eaton MD, Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (II). J Am Med Assoc. 1934;103:1847-63.
- [50] Eaton MD, Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (III). J Am Med Assoc. 1934;103:1934-39.
- [51] Sulakvelidze A, Kutter E. Bacteriophage therapy in Humans. In: Sulakvelidze A, Kutter E, eds. *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton: CRC Press 2005:381-436.
- [52] McKinstry M, Rotem E. Use of phages in therapy and bacterial detection. In: Waldor M, Friedman D, Sandkar L, eds. *Phages: Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington, DC.: ASM Press 2006:430-40.
- [53] Appelmans R. Le bactériophage dans l'organisme. Comp Rend Soc de Biol. 1921;85:722-24.

- [54] Nungester WJ, Watrous RM. Accumulation of bacteriophage in spleen and liver following its intravenous inoculation. *Proc Soc Exper Biol Med.* 1934;31:901-5.
- [55] Inshley C. The crucial role of Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clin Exp Immunol.* 1969;5:173-87.
- [56] Evans A. Inactivations of anti-streptococcus bacteriophage by animal fluids. . *Pub Health Rep.* 1931;48:411-28.
- [57] Larkum N. Bacteriophage in clinical medicine. *J Lab Clin Med.* 1932;17:675-80.
- [58] Straub M, M. A. Studies on commercial bacteriophage products. . *J Am Med Assoc.* 1933;100:110-13.
- [59] Krueger A, Scribner E. The bacteriophage: Its nature and its therapeutic use (II). *J Am Med Assoc.* 1941;116:2269-77.
- [60] Krueger A, Scribner E. The bacteriophage: Its nature and its therapeutic use (I). *J Am Med Assoc.* 1941;116:2160-67.
- [61] Chanishvili N, Chanishvili T, Barrow P *et al.* Phages and their application against drug-resistant bacteria. *J Chem Technol Biotechnol.* 2001;76:689-99.
- [62] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:649-59.
- [63] Dubos R, Straus J, Pierce C. The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effects against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *J Exp Med.* 1943;78:161-68.
- [64] Lewis S. Arrowsmith. New York: Hartcourt and Brace. 1925.
- [65] Stone R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. *Science.* 2002. 25;298:728-31.
- [66] Osborne L. A Stalinist antibiotic alternative. *New York Times Magazine.* 2000 Sunday, February 6.
- [67] Pearson H. From Russia with gloves Ex-Soviet Union viruses could fill antibiotic gap. *Nature.* 2002.
- [68] Grimont PA, Grimont F, Lacut JY, Issanchou AM, Aubertin J. Treatment of a case of endocarditis caused by *Serratia* with bacteriophages. *Nouv Presse Med.* 1978;24;7:2251.
- [69] Lang G, Kehr P, Mathevon H *et al.* J. Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* 1979;65:33-7.
- [70] Shera G. Phage treatment of severe burns. *Br Med J.* 1970;1:568-9.
- [71] Martin P, Martin P. Méningite posttraumatique à pyocyanique traitée par un bactériophage adapté intrarachidien. *Acta Chir Belgica.* 1959;1:85-90.
- [72] Sayamov R. Treatment and prophylaxis of cholera with bacteriophage. *Bull WHO.* 1963;28:361-67.
- [73] Pollitzer R. Cholera. World Health Organization. 1959.
- [74] Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as

antimicrobial agents. J Infect. 1998;36:5-15.

[75] Levy B. The antibiotic paradox: how misuse of antibiotics destroy their curative power. Cambridge: Perseus Press 2002.

[76] Levy B, Marshall B. Antimicrobial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Med. 2004;10:s122-s29.

[77] Projan J. New (and not so new) antibacterial targets: from where and when will the novel drugs come? Curr Opin Pharmacol 2002;2:513-22.

[78] Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. III. Detailed evaluation of the results obtained in further 150 cases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1984;32:317-35.

[79] Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. II. Detailed evaluation of the results. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1983;31:293-327.

[80] Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1983;31:267-91.

[81] Slopek S, Kucharewicz-Krukowska A, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1985;33:261-73.

[82] Slopek S, Kucharewicz-Krukowska A, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. V. Evaluation of the results obtained in children. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1985;33:241-59.

[83] Slopek S, Kucharewicz-Krukowska A, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. IV. Evaluation of the results obtained in 370 cases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1985;33:219-40.

[84] Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1987;35:569-83.

[85] Smith HW, Huggins MB. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. J Gen Microbiol. 1983;129:2659-75.

[86] Smith HW, Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol. 1982;128:307-18.

[87] Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J Gen Microbiol. 1987;133:1111-26.

[88] Bull JJ, Levin BR, DeRouin T, Walker N, Bloch CA. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. BMC Microbiol. 2002;2:35.

- [89] Carlton RM. Phage therapy: Past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1999;47:267-74.
- [90] Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997;5:268-71.
- [91] Dixon B. New dawn for phage therapy. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:186.
- [92] Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:489-97.
- [93] Soothill J, Hawkins C, Anggard E, Harper D. Therapeutic use of bacteriophages. *Lancet Infect Dis*. 2004;4:544-5.
- [94] Clark J, March J. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology*. 2006;In Press.
- [95] Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol*. 1992;37:258-61.
- [96] Berchieri A, Jr., Lovell MA, Barrow PA. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol*. 1991;142:541-9.
- [97] Soothill JS. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns*. 1999;20:209-11.
- [98] Soothill J, Lawrence J, Ayliffe G. Bacteriophage prevention of skin graft destruction of pig skin in vitro by *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Sci Res*. 1988;16:1287-8.
- [99] Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, *et al*. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 16;93:3188-92.
- [100] Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B *et al*. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2002;70:204-10.
- [101] Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T *et al*. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis*. 2003 15;187:613-24.
- [102] Wang J HB, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Reed E, Ding L, Gong J, Li QQ. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med*. 2006;17:309-17.
- [103] Wang J HB, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Tao D, Ding L, Reed E, Gong J, Li QQ. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med*. 2006;17:347-55.
- [104] Vinodkumar C, Neelagund Y, Kalsurmath S. Bacteriophage in the treatment of experimental septicemic mice from a clinical isolate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Commun Dis* 2005;37:18-29.
- [105] Barrow P, Lovell M, Berchieri A, Jr. Use of lytic bacteriophage for control of

experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Diagn Lab Immunol. 1998;5:294-8.

[106] Wills QF, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:1220-1.

[107] Gill J, Pacan J, Carson M, Leslie K, Griffiths M, Sabour P. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:2912-8.

[108] Faruque S, Islam M, Ahmad Q, Faruque A, Sack D, Nair G *et al.* Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:6119-24.

[109] Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, Faruque AS, Ghosh AN, Nair GB *et al.* Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:1702-7.

[110] Chibani-Chennoufi S, Sidodi J, Bruttin A, Dillmann M-L, Kutter E, Firdausi Q, *et al.* Isolation of *Escherichia coli* bacteriophage from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh. J Bacteriol. 2004;186:8287-94.

[111] Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2558-69.

[112] Bruttin A BH. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:2874-8.

[113] Jensen M, Faruque S, Mekalanos J, Levin B. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;21:4652-7.

[114] Curtin J, Donlan R. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:1268-75.

[115] Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. Nat Rev Microbiol. 2004;2:166-73.

[116] Payne RJ, Jansen VA. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. J Theor Biol. 2001;208:37-48.

[117] Payne RJ, Phil D, Jansen VA. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. Clin Pharmacol Ther. 2000;68:225-30.

[118] Payne RJ, Jansen VA. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. Clin Pharmacokinet. 2003;42:315-25.

[119] Levin B, Bull J. Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage. Am Nat. 1996;147:881-98.

[120] Weld RJ, Butts C, Heinemann JA. Models of phage growth and their applicability to phage therapy. J Theor Biol. 2004;227:1-11.

[121] Kasman L, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt M, Norris J. Overcoming the

phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol.* 2002;76:5557-64.

[122] Inchley C. The activity of mouse Kupffer cell following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clin Exp Immunol.* 1969;5:173-87.

[123] Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol.* 2005;98:7-13.

[124] Kucharewicz-Krukowska A, Slopek S. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1987;35:553-61.

[125] Przerwa A, Zimecki M, Switala-Jelen K, Dabrowska K, Krawczyk E, Luczak M, et al. Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Med Microbiol Immunol* 2006;195:143-50.

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

[127] Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Mulczyk M, Gorski A. Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34:135-8.

[128] Courvalin PD, HB. Flandrois, JP. Goldstein, F. Bactéricidie - Aspects théoriques et thérapeutiques. Paris: Maloine 1990.

[129] Hersherberger EK, EA. Zervos, GW. Rybak, M.J. Comparison of a rabbit model of endocarditis and an in vitro model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1921-24.

[130] Perlman BF, L. Experimental endocarditis II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med.* 1971;44:206-13.

[131] Salter R, Bell R, Keeley F. The protective effect of continuous passive motion on living cartilage in septic arthritis. An experimental investigation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res.* 1981;159:223-47.

[132] Houssaye C. Evaluation de l'efficacité in vitro d'une suspension de bactériophages antistaphylococcique à usage thérapeutique. Paris: Paris VII; 2004.

[133] Reynaud A, Cloastre L, Bernard J, Laveran H, Ackermann HW, Licois D, et al. Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy. *Vet Microbiol.* 1992;30:203-12.

[134] Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X *et al.* Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med.* 2006;17:347-55.

[135] Wills QF, Kerrigan C, Soothill J. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.*

2005;49:1220-2.

[136] O'Flaherty S, Ross R, Meaney W, Fitzgerald G, Elbreki M, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:1836-42.

[137] Schrader H, Schrader J, Walker J, Wolf T, Nickerson K, Kokjohn T. Bacteriophage infection occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved fo 5 years. *Can J Microbiol* 1997;43:1157-63.

[138] Hanlon G, Denyer S, Ollif CJ, Ibrahim L. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration throuh *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:2746-53.

Liste des tableaux

- **Tableau I** : Avantages et inconvénients des phages en thérapeutique
- **Tableau II** : Bactéries étudiées pour l'étude de la spécificité de la suspension de phages
- **Tableau III** : Traitements administrés dans le modèle d'endocardite expérimentale
- **Tableau IV** : Différents régimes thérapeutiques dans le modèle d'arthrite à *S. aureus*
- **Tableau V** : Concentration de phages de la suspension mesuré sur 4 souches de *S.aureus*
- **Tableau VI** : Concentration bactérienne moyenne dans les caillots de fibrine exposés ou non à la suspension de phages
- **Tableau VII** : Etude de l'activité *in vivo* de la suspension de phages sur les souches *S.aureus* P9 et NA8 dans le modèle d'endocardite
- **Tableau VIII** : Activité *in vivo* de la suspension de phages sur *S. aureus* ANT dans le modèle d'arthrite
- **Tableau IX** : Concentration de phages dans différents tissus
- **Tableau X** : Cinétique plasmatique des phages

LISTE DES FIGURES

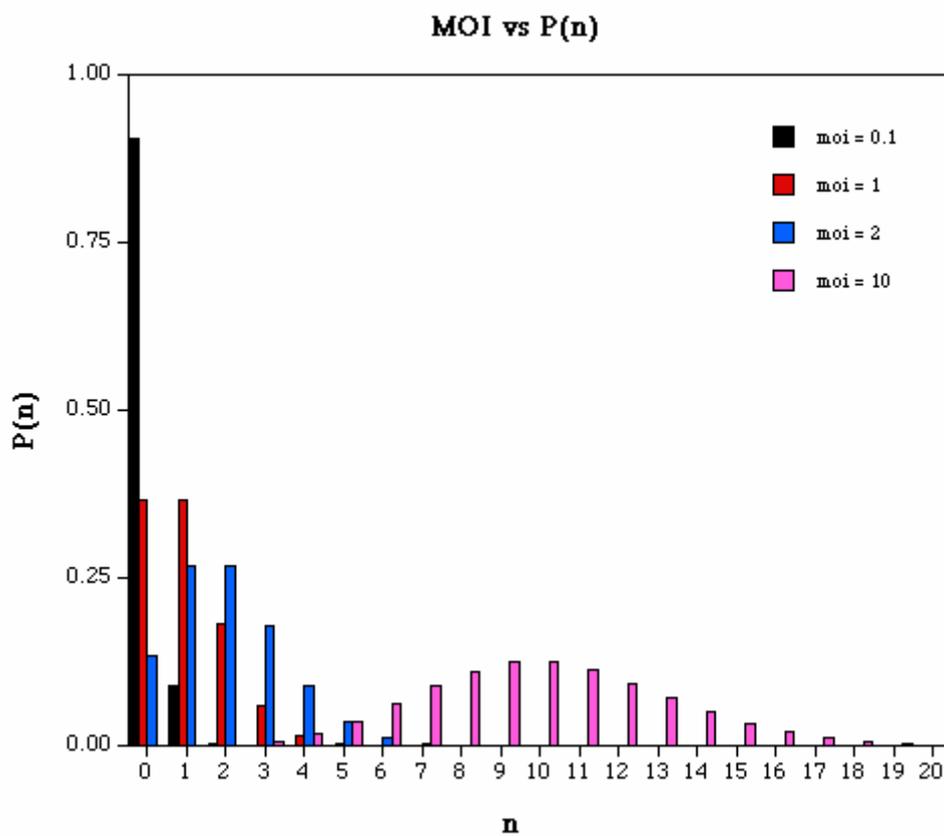
- **Figure 1** : Structure schématique d'un phage caudé
- **Figure 2** : Diversité morphologique des phages
- **Figure 3** : Représentation schématique du cycle lytique et lysogénique
- **Figure 4** : Le cercle lytique, exemple du phage λ
- **Figure 5** : Représentation schématique du mécanisme de la lyse bactérienne par le couple holines-endolysines
- **Figure 6** : « Single step growth curve »
- **Figure 7** : Schéma du protocole expérimental sur les caillots de fibrine
- **Figure 8** : Sensibilité des staphylocoques à coagulase négative à la suspension de phages
- **Figure 9** : Vitesse de bactéricidie de la suspension de phages pure sur 4 souches de *S. aureus*
- **Figure 10 a et b** : Activité lytique de la suspension de phages originale sur SA ANT à différents MOI (a) et évolution du titre de phages (b)
- **Figure 11 a et b** : Activité lytique de la suspension de phages adaptés à SA ANT à différents MOI (a) et évolution du titre de phages (b)
- **Figure 12** : Activité de la suspension de phages dans les caillots de fibrine (a) et dans les surnageants (b)
- **Figure 13** : Activité comparée de la suspension de phages dans les caillots de fibrine agités et non agités
- **Figure 14** : Efficacité de la suspension de phages par voie intraveineuse et de la vancomycine sur 2 souches de *S. aureus* dans le modèle d'endocardite aortique
- **Figure 15** : Efficacité de la suspension de phages par voie intra-articulaire sur SA ANT dans le modèle d'arthrite aiguë

LISTE DES PHOTOS

- **Photo 1** : Suspension de phages
- **Photo 2** : Endocardite expérimentale: abord carotidien
- **Photo 3** : Arthrite expérimentale : inoculation bactérienne
- **Photo 4** : Méthode des spots
- **Photo 5** : Plages de lyse sur gélose en double couche
- **Photo 6** Caillot de fibrine
- **Photo 7** : Coupe d'un caillot : réseau de fibrine et amas de *S. aureus* ANT en microscopie à balayage

Loi de Poisson appliquée aux phages

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$



m = multiplicity of infection (MOI)
n = nombre de phages infectant une cellule
P(n) = probabilité qu'une cellule soit infectée par n phages

NOM : GROSSI

PRENOM : OLIVIER

Titre de la Thèse : Evaluation de l'activité lytique d'une suspension de bactériophages anti-staphylococciques : Corrélation *in vitro-in vivo*

Résumé de la Thèse :

L'utilisation des bactériophages (phages) en tant que thérapeutique alternative ou adjuvante à l'antibiothérapie, est actuellement revisitée avec succès par un certain nombre d'études expérimentales.

L'impasse thérapeutique face à l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et la découverte de l'utilisation extensive des phages en thérapeutique humaine dans les pays de l'Est ont motivé ce regain d'intérêt.

Plusieurs auteurs ont souligné l'absence de techniques *in vitro* fiables permettant de prédire l'activité *in vivo* des bactériophages, et peu d'études ont évalué la phagothérapie sur *Staphylococcus aureus* dans des modèles expérimentaux discriminants.

L'objet de notre étude a été d'évaluer l'activité lytique d'une suspension polyclonale de bactériophages anti-staphylococciques, *in vitro*, en milieu liquide et dans des caillots de fibrine, puis *in vivo*, dans deux modèles animaux d'infections à *S. aureus*, proches des conditions rencontrées en pathologie humaine. La suspension de phages, très rapidement bactéricide *in vitro* sur les différentes souches de *S.aureus* a montré une activité lytique plus lente et moins intense dans les caillots de fibrine. En revanche elle a été inefficace dans les deux modèles expérimentaux. En dernière partie de ce travail nous discutons des problèmes de corrélations *in vitro-in vivo*.

Mots Clés :

Bactériophages

Activité lytique *in vivo*

Staphylococcus aureus

Phagothérapie

Activité lytique *in vitro*

Modèles expérimentaux