

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES PHARMACEUTIQUES

La phagothérapie

un traitement prometteur contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa* ?

Seka, Lisa-Marie

Award date:
2022

Awarding institution:
Université de Namur
Université Catholique de Louvain

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Faculté de Médecine

Département de Pharmacie

La phagothérapie : un traitement prometteur contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa* ?

Auteur : Lisa-Marie SEKA

Promoteur: Catherine LAMBERT DE ROUVROIT

Année académique 2021-2022

Intitulé du master et de la finalité : Master en Sciences pharmaceutiques à finalité spécialisée

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à ma promotrice, madame Catherine Lambert de Rouvroit, pour sa patience, sa disponibilité, ses conseils et ses recommandations qui ont contribué à bien orienter mon mémoire.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mes parents, Gossan et Albertine.

Papa, merci pour ton soutien car sans toi, cet objectif de quitter mon pays et ma famille pour espérer un jour devenir une pharmacienne n'aurait pas été possible. Merci d'avoir cru en moi au point de m'accorder cette confiance et de financer entièrement mon séjour et mes études en Belgique, sans avoir une certitude de réussite. Merci de continuer à croire en moi, même quand moi je ne crois plus en moi. Merci infiniment papa.

Maman, merci de m'avoir soutenue et de m'avoir laissé partir quand j'ai voulu quitter mon pays et ma famille afin d'espérer réaliser mon objectif de devenir un jour une pharmacienne. Tu as toujours été là pour moi, tu as su me conseiller, me guider et me redonner du courage quand c'était difficile, loin de vous. Tu ne le sais peut-être pas, mais grâce à toi, je sentais beaucoup moins les milliers de kilomètres qui nous séparaient et qui nous séparent encore. Merci infiniment maman.

À mes sœurs, Audrey et Axelle, merci pour votre soutien, vous avez su vous montrer présentes durant les bons moments et les moments plus durs, et ce malgré la distance physique qui nous sépare. Merci infiniment. Merci à ma tante Marie-Chantal et à mon cousin Kevin, pharmaciens, qui m'ont inspiré dans le choix de mon parcours et qui ont su m'encourager et me donner des conseils.

À Camille, merci du fond du cœur d'avoir été présent pour moi durant quasiment toute la période de mes études. Tu m'as toujours encouragée, conseillée et soutenue, et tu as toujours su être là pour moi malgré la distance. Je te remercie également pour tes relectures, ainsi que les corrections que tu as su apporter à mon mémoire. Je remercie également ta famille, pour son soutien sans faille.

ATTESTATION DE NON-PLAGIAT

Je soussigné(e)

.....SEKA Lisa-Marie.....

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire intitulé :

La phagotherapie: un traitement prometteur contre les infections à Pseudomonas aeruginosa ?

Je suis conscient(e) que le fait de ne pas citer une source ou de ne pas la citer clairement et complètement est constitutif de plagiat, que le plagiat est considéré comme une faute grave au sein de l'Université et qu'il peut être sévèrement sanctionné.

Fait à Namur....., le 04/08/2022.....

Signature de l'Etudiant,



APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE

Afin de mener à bien les recherches sur mon mémoire et d'avoir une base, j'ai d'abord recherché les termes « *Pseudomonas aeruginosa* », « *Pseudomonas aeruginosa* characteristics » et « Phages characteristics », « phages structure » sur PubMed. Ensuite j'ai recherché les termes « *Pseudomonas aeruginosa* biofilms » et « quorum détection » sur PubMed après avoir vu que ces éléments étaient directement ou indirectement liés à la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*. J'ai également consulté la BAPCOC du CBIP pour savoir quels antibiotiques étaient efficaces sur *Pseudomonas aeruginosa*.

La majorité des recherches qui ont suivi étaient faites sur PubMed et Google Scholar. Dans le but de cibler les recherches, j'ai utilisé des MeSH suivant : *Pseudomonas aeruginosa* phages, phage therapy, infected wound *Pseudomonas*, infected wound phages *pseudomonas*, topical phages wounds, phages manufacture...

Pour éviter de n'avoir que des revues, j'ai filtré parfois mes recherches en sélectionnant les études cliniques, les métaanalyses et les revues systématiques. Par ailleurs, je n'ai pu trouver qu'une seule étude randomisée en double aveugles. Vu l'avancée rapide des recherches, j'ai utilisé comme année minimum de publication 2018 pour avoir des études récentes. Il m'est aussi arrivée de trouver des références intéressantes au sein des articles mais qui elles étaient beaucoup plus anciennes.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFMPS : Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (Belgique)

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

dsDNA: ADN double brin (double strand)

EMA : European Medicine Agency

EPS : Exopolysaccharides

ESKAPE : Escherichia coli, Seratia, Klebsiella, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobactéries

I.M: intra-musculaire

I.P : intra-péritonéal

MDR : Multi-Drug-Resistant

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFU : Unité formant plaque

S.C: sous-cutané

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	1
2	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	3
2.1	LE BIOFILM	4
2.2	LA DÉTECTION DU QUORUM	5
2.3	ANTIBIOTHÉRAPIE ET RÉSISTANCE BACTÉRIENNE	6
3	LES BACTÉRIOPHAGES	8
3.1	GÉNÉRALITÉS	8
3.2	PHARMACOLOGIE DES BACTÉRIOPHAGES	10
4	LA PHAGOTHÉRAPIE	12
4.1	LES AVANTAGES DE LA PHAGOTHÉRAPIE	13
4.2	LES PLAIES CHRONIQUES	15
4.2.1	LE CAS DES BRÛLURES	17
4.2.2	VOIE D'ADMINISTRATION TOPIQUE	21
4.3	LIMITES DE LA PHAGOTHÉRAPIE	23
4.4	PERSPECTIVES	25
4.5	OPTIMISER L'EFFICACITÉ	27
4.6	SYNERGIE DES ANTIBIOTIQUES ET DES PHAGES	28
4.7	FABRICATION	29
5	LES ENDOLYSINES COMME ALTERNATIVE	34
6	CONCLUSION	36
7	BIBLIOGRAPHIE	37

1 INTRODUCTION

Une infection qualifiée de « nosocomiale » signifie qu'elle est contractée par un patient au cours de son hospitalisation. Ces infections, notamment bactériennes, sont en constante augmentation, dans les services de réanimation et de soins intensifs, en raison des multiples portes d'entrée utilisées pour effectuer les soins (cathétérisme vasculaire, intubation, sondage vésical, etc.) (Dictionnaire de l'académie médicale 2021). Les enjeux face à ces infections sont importants : ces dernières constituent une cause d'augmentation de la durée d'hospitalisation (enjeu social), du coût des soins (enjeu économique) et de la mortalité.

Les dispositifs de prévention dans les hôpitaux n'étant pas suffisants, il est essentiel que l'arsenal thérapeutique mis à disposition pour traiter ces infections soit efficace. Cependant, même ces dispositions thérapeutiques s'essoufflent et présentent des limites qui s'accroissent au cours du temps : les bactéries ciblées par les antibiotiques développent des mécanismes biologiques par lesquels elles échappent à l'effet thérapeutique et arrivent donc à survivre. Ce phénomène est appelé la résistance bactérienne. Celle-ci augmente d'année en année et exerce une pression sur les hôpitaux, tant pour les patients que pour le personnel de santé : pour les professionnels de la santé, la résistance bactérienne rend plus complexe la prise en charge de ces infections, et pour le patient, la durée d'hospitalisation s'allonge, souvent sans perspective de guérison et avec comme seule issue la mort.

Le 27 février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. Dans le groupe le plus critique de cette liste se trouvent les bactéries multi-résistantes, regroupées sous l'acronyme « ESKAPE », constituant une grande menace dans les hôpitaux : *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les entérobactéries (*Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, et *Proteus*) (OMS 2017).

Pseudomonas aeruginosa en particulier est une bactérie qui est naturellement résistante aux antibiotiques, laissant à disposition des soignants peu d'options d'antibiothérapie, qui deviennent de moins en moins efficaces. C'est donc un problème grave de santé publique auquel il est important de trouver des solutions. Parmi celles-ci, se trouvent les bactériophages : un bactériophage est un virus capable d'infecter une bactérie. Le terme « phagothérapie » désigne l'utilisation de bactériophages afin de neutraliser la bactérie ciblée. La phagothérapie a

été proposée dans le traitement des souches de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, mais est-elle vraiment un traitement prometteur contre les infections résistantes à *Pseudomonas aeruginosa* ? Pour répondre à cette problématique, nous allons premièrement aborder les généralités concernant *Pseudomonas aeruginosa* afin d'en savoir plus sur cette bactérie. Puis, nous allons nous intéresser aux bactériophages notamment à leur structure et leur mode de fonctionnement. Ensuite, nous allons passer en revue toutes les informations dont on dispose actuellement sur la phagothérapie : son histoire, quelques études sur son efficacité contre *Pseudomonas aeruginosa*, son avantage, ses limites, et les perspectives de résolution des limites évoquées. Enfin, une partie sur une autre alternative aux antibiotiques mais qui est dérivée des bactériophages sera abordée.

2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste à l'origine de morbidités et de décès chez les patients ayant un système immunitaire affaibli ou ayant des maladies chroniques (Diggle et al. 2020). Sa nature et ses capacités d'adaptation lui confèrent une résistance à la majorité des antibiotiques classiquement prescrits en cas d'infection. Ceci mène inévitablement à un problème majeur de santé publique.

En 2017, *Pseudomonas aeruginosa* a été reconnu comme l'un des pathogènes les plus mortels et a été repris dans la liste des bactéries en priorité dans la recherche et le développement de nouveaux traitements antibiotiques de l'OMS. Les populations à risque d'être infectées par ce germe sont celles qui se trouvent à l'hôpital tels que les patients sous respirateur, les patients brûlés, les patients atteints de neutropénie, les malades chroniques, les patients possédant du matériel médical invasif (Bush et al. 2020), les patients souffrant d'un cancer, ceux sortant d'une opération chirurgicale et ceux atteints de VIH (Thi et al. 2020), les néonataux, les patients souffrant de bronchectasies (Bédard et al. 2016). Il est néanmoins important de souligner que des malades souffrant de VIH avec un stade avancé ou de mucoviscidose peuvent être infectés par *Pseudomonas aeruginosa* en dehors de l'hôpital : cela ne constitue donc pas une infection nosocomiale. Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* superficielles telles que la folliculite, l'otite externe et l'ulcère de la cornée, peuvent se développer chez des individus totalement sains.

Pseudomonas aeruginosa mesure entre 1 et 5 microns de long et entre 0,5 et 1,5 microns de diamètre. C'est un bacille gram négatif ubiquitaire, hétérotrophe, motile et aérobie. Néanmoins, il est tout aussi capable de pousser en milieu anaérobie à l'aide de nitrate ou d'arginine (Diggle et al. 2020). Sa température optimale de croissance est de 37 degrés, mais il survit tout aussi bien entre 10 et 42°C : il a la particularité de pouvoir s'adapter à n'importe quel environnement. Par exemple, ses nutriments habituels sont les acides gras et organiques mais lorsque ceux-ci ne sont pas disponibles, il est capable d'utiliser d'autres sources carbonées. De plus, sa capacité à former ce qu'on appelle un biofilm le protège des agresseurs extérieurs (notamment des antibiotiques), permettant ainsi son développement et donc une infection résistante et persistante. *Pseudomonas aeruginosa* possède une affinité innée pour le développement de la résistance aux antibiotiques. Cette caractéristique pose un réel problème quant à l'utilisation thérapeutique définie des antibiotiques contre cette bactérie. Cette résistance découlerait de l'imperméabilité du lipopolysaccharide présent à la surface de sa

membrane externe. De plus, *Pseudomonas aeruginosa* abrite des plasmides résistants aux antibiotiques et est capable de transférer ces gènes par transduction et conjugaison (Arumagam et al. 2018).

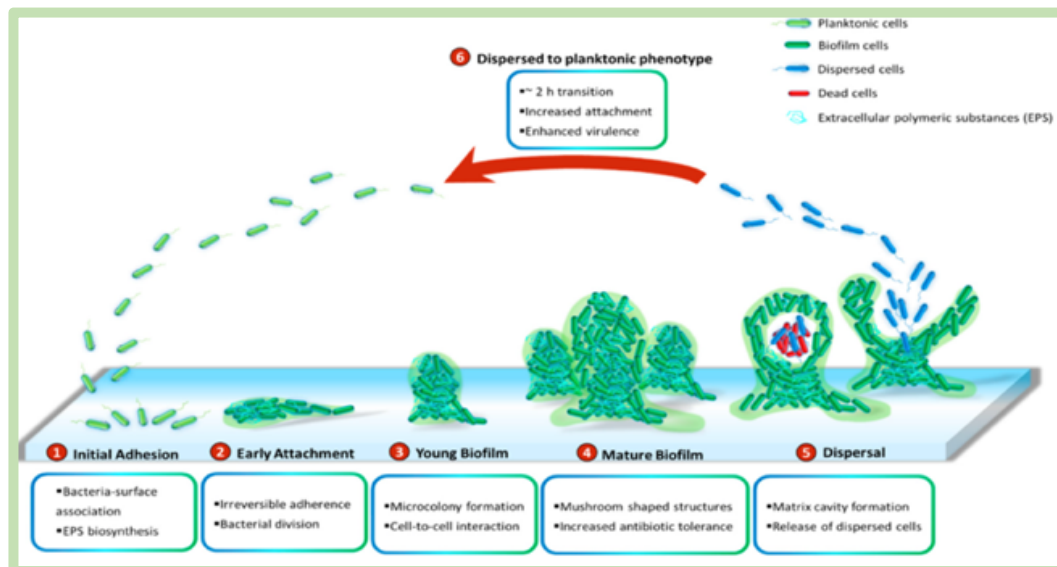
Le biofilm qu'est capable de former *Pseudomonas aeruginosa* constitue une barrière tant pour les antibiotiques que pour les bactériophages. Il est donc important de s'y intéresser de plus près afin de réunir les caractéristiques qui lui confèrent cette résistance.

2.1 LE BIOFILM

Un biofilm est une structure composée d'agrégats de bactéries qui tiennent grâce à une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides (Psl, Pel et alginate). Ces derniers sont impliqués dans le processus d'adhésion à la surface cible, à la formation et à la stabilité du biofilm. Il existe également de l'ADN extracellulaire (eDNA) qui est libéré dans cette structure suite à un stress causé par une antibiothérapie et constitue une source de nutriment pour les bactéries du biofilm et une protection des agresseurs en acidifiant l'environnement. Le biofilm est quasiment imperméable, notamment aux macrophages et aux antibiotiques dans le corps humain. La majorité des bactéries peuvent former des biofilms tant qu'il existe une surface à laquelle elles peuvent s'accrocher et c'est le cas pour *Pseudomonas aeruginosa* (Thi et al. 2020). En effet, c'est une bactérie reconnue pour sa capacité à développer cette structure particulièrement résistante, constituant son atout lors d'une infection opportuniste. Les cas les plus courants d'infection se retrouvent chez les patients possédant un matériel médical invasif (sonde, un cathéter, une prothèse), les patients souffrant de brûlures et les patients atteints de mucoviscidose. Dans ces trois situations, la bactérie a à sa disposition une surface (inerte ou épithéliale) sur laquelle elle peut se lier et entamer la formation de son biofilm. La formation du biofilm se déroule en cinq étapes (**Figure 1**) : tout d'abord, il y a l'initiation de l'adhésion qui représente le moment où la bactérie va adhérer de façon réversible à une surface donnée grâce à ses flagelles et à ses pili. La deuxième étape est l'adhésion qui correspond au moment où l'attache à la surface devient irréversible. Ensuite on aura le développement d'un biofilm dit « immature » où les bactéries vont se propager, toutes attachées, en une structure de plus en plus organisée de microcolonies. Ce biofilm va donc devenir par la suite « mature » et les microcolonies vont évoluer en une structure qui ressemble à un champignon. Pour finir, la structure en forme de champignon va s'ouvrir : c'est la dispersion du biofilm. La structure

intérieure de la matrice du biofilm est détruite par une autolyse cellulaire libérant ainsi des bactéries qui vont aller recommencer le processus de formation du biofilm.

Figure 1 Cycle du développement d'un biofilm (Thi et al. 2020)



Une telle structure est établie grâce à la bonne communication des bactéries entre elles. Cette communication se nomme « la détection du quorum ».

2.2 LA DÉTECTION DU QUORUM

La détection du quorum ou quorum sensing est un mécanisme de communication de cellule à cellule basé sur une transmission de signal dépendant de la densité de la population bactérienne. Les signaux déclenchent des changements au niveau des comportements des bactéries lorsque leur population atteint une densité critique donnée. En effet, lorsque cette densité est atteinte, il y a accumulation de signaux : plus la population augmente, plus les signaux vont augmenter et lorsque la concentration en signaux atteint un seuil critique, ceux-ci vont interagir avec leurs récepteurs et entraîner un changement dans l'expression des gènes dans la population (Abisado et al. 2018). Il existe plusieurs types de détection du quorum et ce mécanisme est présent dans plusieurs types de bactéries, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa*, et est impliqué dans la virulence de la bactérie. Ceci fait du quorum sensing une cible de choix pour les antibiotiques afin de baisser la virulence de la bactérie : l'objectif est de perturber la communication entre les bactéries en dégradant les molécules de signal ou en

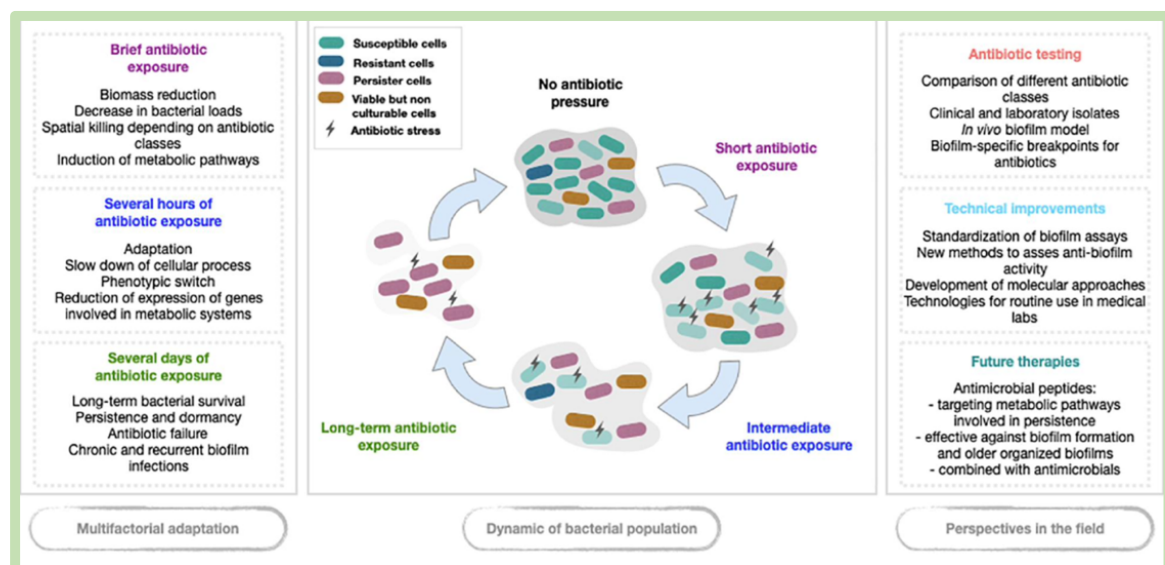
bloquant les récepteurs des molécules de signalisation. Cette perturbation entraînerait une déstabilisation du biofilm et donc permettrait aux antibiotiques de finalement atteindre les bactéries. *Pseudomonas aeruginosa* produit des exotoxines tels que la pyocyanine, l'exotoxine A et le cyanure d'hydrogène, et la majorité de ces molécules est également régulée par la détection du quorum (Diggle et al. 2020).

Le biofilm, formé grâce à la détection du quorum des bactéries, forme une barrière contre les antibiotiques. Néanmoins, *Pseudomonas aeruginosa* peut également réussir à survivre si elle possède des gènes de résistance à des antibiotiques. Dans ce cas, la résistance est favorisée par l'antibiothérapie.

2.3 ANTIBIOTHÉRAPIE ET RÉSISTANCE BACTÉRIENNE

La résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* peut être acquise horizontalement grâce à la communication entre les bactéries menant à un transfert du gène de résistance entre elles, ou verticalement par mutation de gènes présents dans le génome (Diggle et al. 2020). Ce transfert est favorisé à la suite d'une pression de sélection exercée par une antibiothérapie. Dans la couche la plus profonde du biofilm, on trouve ce que l'on appelle les cellules persistantes (ou cellules dormantes). En neutralisant les cellules de la couche externe, les antibiotiques libèrent au fur et à mesure ces cellules dormantes persistantes qui lui sont résistantes (Soares et al. 2020).

Figure 2 Effet de l'antibiothérapie sur le biofilm (Soares et al. 2020)



Comme antibiotiques actuellement actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* (CBIP 2020), il y a tout d'abord les quinolones (cependant les souches résistantes sont en augmentation), les aminoglycosides (actifs contre *Pseudomonas aeruginosa*, mais en association avec une pénicilline ou une céphalosporine par exemple), l'association pipéracilline (acyluréidopénicilline) et tazobactam (inhibiteur de bêta-lactamase), la ceftazidime (céphalosporine de troisième génération), les carbanépèmes, les monobactames et la polymyxine. Cependant, il est important de noter que les antibiotiques en monothérapie n'éradiquent pas entièrement les biofilms. De ce fait, les professionnels de la santé priorisent dès lors les combinaisons d'antibiotiques (Soares et al. 2020). Il est donc intéressant d'envisager dans quelle mesure la phagothérapie pourrait jouer un rôle majeur dans la recherche d'alternative aux antibiotiques.

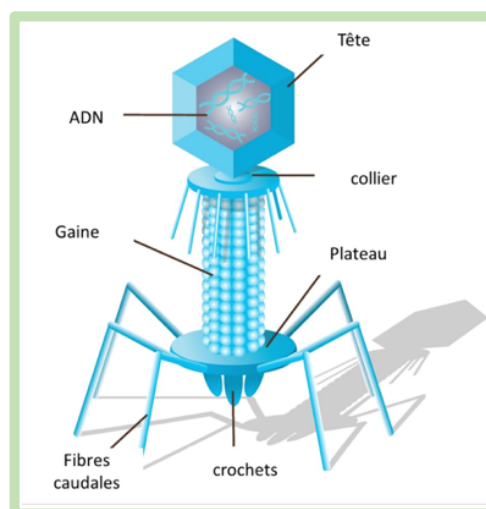
Avant d'explorer la phagothérapie, il est important de connaître les caractéristiques de l'élément clé de cette thérapie : les bactériophages.

3 LES BACTÉRIOPHAGES

3.1 GÉNÉRALITÉS

Les phages ou bactériophages sont des virus qui infectent uniquement les bactéries : ils représentent donc naturellement une alternative aux traitements antibiotiques classiques lors d'infection à bactéries multi-résistantes. Il existe différents types de bactériophages : les monophages qui reconnaissent uniquement un seul type de récepteur à la surface d'une bactérie, ce qui fait d'eux des phages dits « spécifiques » et il y a les polyphages qui eux reconnaissent plusieurs types de récepteurs à la surface d'une bactérie. Un phage est une entité qui ne possède aucune machinerie métabolique, juste du matériel génétique à l'intérieur de sa tête (Harada et Silva 2018). Sa structure est simple (**figure 3**), composée d'une tête formée par une capside, qui contient tout le matériel génétique. En fonction du type de matériel génétique contenu dans la capside, il est possible de classer les bactériophages : ADN simple brin (ssDNA), ADN double brin (dsDNA), ARN simple brin (ssRNA) et ARN double brin (dsRNA). Le bactériophage possède également un collier, une gaine spiralée contractile, aussi appelée la queue du bactériophage, un plateau se trouvant à la base de la gaine, contenant les protéines qui peuvent se fixer à leur récepteur spécifique, des fibres caudales (il y en a généralement six, qui sont capables de reconnaître des molécules spécifiques) et des crochets afin de s'attacher à la bactérie, la perforer et faire entrer le matériel génétique.

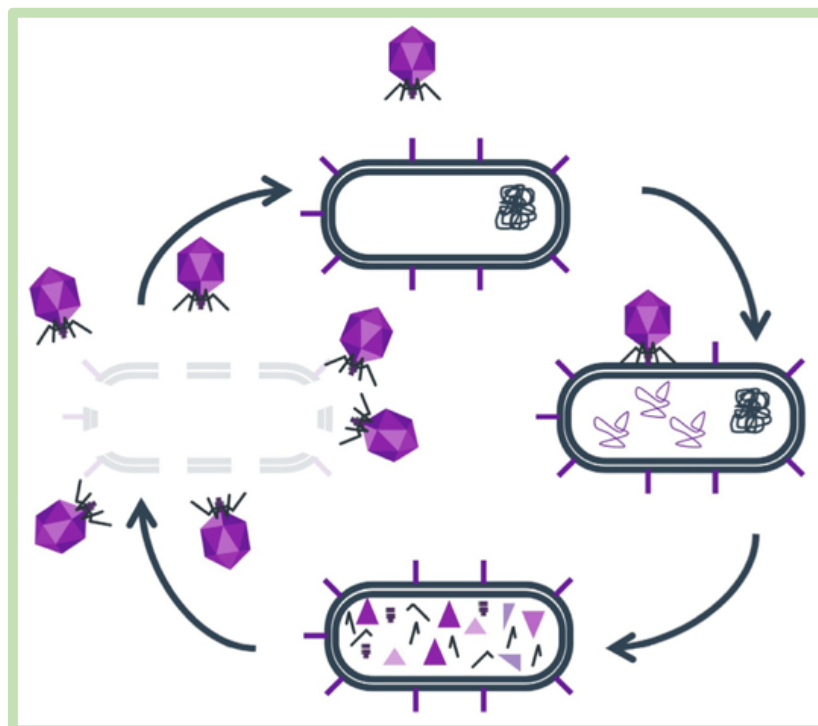
Figure 3 Structure d'un bactériophage. Source: <https://www.simplyscience.ch/fr/jeunes/decouvre/les-bacteriophages-des-virus-qui-soignent?r=1>



Ce sont les bactériophages dits « lytiques » ou « virulents » qui réunissent le potentiel nécessaire pour traiter une infection bactérienne car ils peuvent neutraliser les bactéries (Bono et al. 2021). En effet, le bactériophage commence par s'attacher à la surface de la bactérie à l'aide de ses fibres caudales qui reconnaissent le récepteur de la bactérie (**Figure 4**). Cette interaction entraîne un changement conformationnel du bactériophage, menant à la contraction de la gaine contractile et donc l'injection du matériel génétique (ARN ou ADN) à l'intérieur de l'hôte. Une fois cette étape terminée, ce matériel génétique va s'insérer dans le matériel génétique de la bactérie et utiliser sa machinerie pour se répliquer.

Les nouveaux bactériophages vont donc être assemblés et la machinerie génétique de la bactérie en produira jusqu'à ce que celle-ci éclate, libérant ainsi une multitude de nouveaux bactériophages qui vont encore aller à la recherche de nouvelles bactéries à infecter. Grâce à ce cycle, ils contrôlent la population bactérienne. Il est important de préciser que pour qu'un phage puisse infecter une bactérie, celle-ci doit exprimer à sa surface un récepteur, spécifique des protéines présentes à la base du plateau du bactériophage. Sans le récepteur correspondant, il n'est pas possible pour le bactériophage d'injecter son matériel génétique dans la bactérie (Harada et al. 2018).

Figure 4 Cycle d'un bactériophage lytique (Bono et al. 2021)



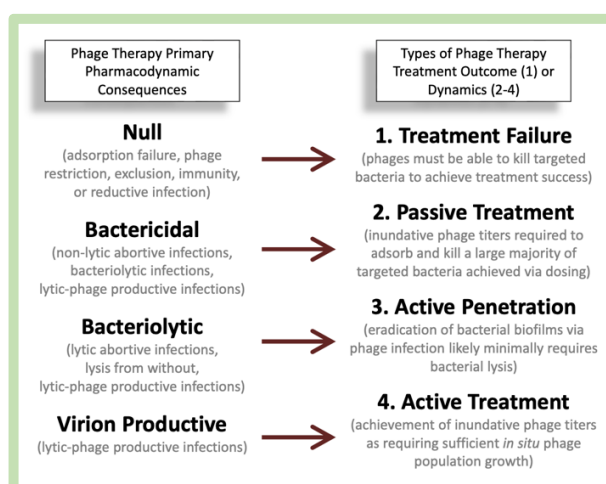
Ces mécanismes montrent comment le bactériophage interagit avec les bactéries qui sont leurs hôtes. Cependant, il serait intéressant de savoir quels effets les bactériophages pourraient avoir dans le cadre d'un traitement *in vivo*.

3.2 PHARMACOLOGIE DES BACTÉRIOPHAGES

La pharmacologie des bactériophages est différente de celle des médicaments classiques. En effet, le fait qu'ils ne soient pas significativement toxiques pour l'humain et qu'ils aient la capacité d'augmenter leur concentration *in vivo* permet de ne pas avoir à déterminer des doses toxiques. Il existe plusieurs types d'infection : une infection bactéricide qui représente l'infection d'une bactérie par un bactériophage menant à la mort de la bactérie sans qu'elle n'éclate (traitement passif), une infection bactériolytique qui représente l'infection d'une bactérie par un phage résultant à la mort de celle-ci et son éclatement (pénétration active). Un traitement dit « actif » représente l'infection d'une bactérie par un phage résultant à son éclatement et à la libération de nouveaux virions (Danis-Wlodarczyk et al. 2021).

L'infection d'une bactérie par un phage commence toujours avec l'adsorption du phage à la surface de la bactérie. À la suite de cette adsorption, il y a plusieurs issues possibles : l'inactivation du phage, une infection bactéricide, une infection bactériolytique et une production de virion. Une infection bactériolytique est importante pour le traitement des biofilms.

Figure 5 Les différentes issues après l'adsorption des phages sur les bactéries (Danis-Wlodarczyk et al. 2021)



Les bactériophages sont l'instrument de la phagothérapie. Leur capacité à infecter les bactéries représente un atout indéniable dans la bataille contre les résistances bactériennes. Pourquoi n'est-elle plus utilisée ? Pourquoi n'est-elle appliquée qu'en dernier recours dans des conditions cliniques ? Quels sont ses avantages et ses inconvénients ? Quels sont les perspectives pour l'avenir ? Comment pourrait-on en fabriquer de manière industrielle ? Nous essaierons de répondre à ces questions, notamment à l'aide d'études (in vitro et in vivo) centrées sur des plaies chroniques infectées par notre pathogène d'intérêt, *Pseudomonas aeruginosa*.

4 LA PHAGOTHÉRAPIE

C'est en 1915 que les phages ont été découverts par Frederik Twort, mais la phagothérapie en elle-même a été décrite par Felix D'Hérelle en 1917 (Jault et al. 2019). En effet, D'Hérelle a mis en application le principe en traitant des patients avec des bactériophages : le premier patient était un enfant souffrant de dysenterie à qui on a administré un cocktail de bactériophages préalablement fabriqué et testé par D'Hérelle et son collègue Hutinel. L'enfant s'est rétabli. Suite à ce bon résultat, d'Hérelle a poursuivi sa phagothérapie en traitant des patients atteints de choléra et de peste bubonique, toujours avec des cocktails de bactériophages. Il a, par la suite, travaillé avec Giorgi Eliava qui était le directeur de l'institut de bactériologie à Tbilissi en Géorgie : il avait adopté la phagothérapie comme traitement systématique contre les bactéries. Cet institut existe encore aujourd'hui et la phagothérapie y est toujours utilisée.

Il est donc naturel de se demander pourquoi la phagothérapie ne semble-t-elle pas avoir été intégrée dans la thérapie conventionnelle en dehors de la Géorgie? Il existe quelques réponses à cette question. D'une part, ce mode de traitement a été mis de côté en faveur des antibiotiques dès la découverte de la pénicilline par Alexandre Fleming en 1928. En effet, cette découverte a marqué un tournant décisif dans le traitement des infections : de par leur stabilité, leur puissante efficacité (auparavant) et leur coût moindre, les antibiotiques ont naturellement primé face aux bactériophages. D'autre part, la politique a joué un rôle en mettant en opposition la phagothérapie contre les antibiotiques au lieu de les allier : la phagothérapie a longtemps été associée au communisme. Notons également que la barrière de la langue et les craintes des pays occidentaux n'ont pas vraiment permis l'échange d'informations concernant ce type de traitement (Bono et al. 2021).

Pourtant, la phagothérapie possède des points forts : les bactériophages lytiques ont un effet bactéricide (de surcroît ils détruisent la machinerie de l'ADN de la bactérie permettant beaucoup moins de résistance) tandis que les antibiotiques sont soit bactéricides soit bactériostatiques. Les antibiotiques perturbent la flore naturelle des humains contrairement aux bactériophages car ils sont capables d'être très spécifiques à une certaine souche de bactérie.

Plusieurs études *in vitro*, notamment celle d'Arumugam et al. confirment l'efficacité de la phagothérapie sur *Pseudomonas aeruginosa*. Cette étude (Arumugam et al. 2018) avait pour but d'isoler et de caractériser les bactériophages actifs contre des souches Multi-Drug-Resistant

(MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour ce faire, 94 bactériophages ont été isolés à partir d'échantillons d'eaux usées provenant des abords des hôpitaux où séjournaient les patients infectés. Une étude de test de gamme d'hôtes a été réalisée avec tous les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* MDR. Parmi les 51 souches de *Pseudomonas aeruginosa* MDR disponibles, 34 souches ont été infectées par des phages. Certains phages, notamment les phages AP025 et AP006, ont montré un bon taux d'infectiosité de 39 % et 30 %. Le cocktail de phage réalisé dans cette étude en combinant 5 phages (AP002, AP006, AP011, AP025 et AP067) a lysé 62,7 % des souches. Avec les résultats obtenus qui sont plutôt encourageants, on peut conclure que des phages pourraient être utilisés pour le traitement des infections causées par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* MDR, cependant il est nécessaire de réaliser des tests in vivo. Avec les données recueillies jusqu'à présent, il est possible d'affirmer que 94,2 % des phages étant capables d'infecter *Pseudomonas aeruginosa* appartiennent à l'ordre Caudovirales. Cet ordre est composé de trois familles de phages à ADN : les Podoviridae, les Myoviridae et les Siphoviridae. Sur base des résultats de cette étude, l'efficacité des phages doit être évaluée par des études in vivo pour confirmer la spécificité et la sensibilité.

En clair, cette étude in vitro montre la capacité des bactériophages à infecter des souches multirésistantes de *Pseudomonas aeruginosa*. En plus de cette infectiosité, la phagothérapie possède de nombreux avantages.

4.1 LES AVANTAGES DE LA PHAGOTHÉRAPIE

La phagothérapie est intéressante, de par les avantages qu'elle présente. Tout d'abord, les bactériophages ont la capacité de produire des enzymes qui peuvent dissoudre la matrice du biofilm. Cela est un élément essentiel et important pour pouvoir déstabiliser la structure formant le biofilm et ainsi atteindre les bactéries qui se trouvent au cœur de celui-ci (Holger et al. 2021) : les enzymes à l'extérieur de leur capsid dégradent les substances polymères extracellulaires (EPS) et dispersent les biofilms bactériens, ce qui permet au bactériophage d'accéder aux bactéries intégrées dans la matrice EPS. Les nouveaux bactériophages qui seront libérés à la fin du cycle lytique vont amplifier la dispersion du biofilm en éliminant les bactéries intégrées au biofilm dans les couches plus profondes. La phagothérapie existe en monothérapie ou en

multithérapie, c'est-à-dire ce que l'on appelle les « cocktails » de phages. L'étude de Chegini et al. a démontré qu'un cocktail de bactériophage est plus efficace dans la neutralisation du biofilm : en effet, un bactériophage a la capacité de pénétrer dans la matrice composant le biofilm grâce à ses enzymes, mais pour optimiser la destruction de cette matrice, il est intéressant d'utiliser plusieurs phages différents. L'effet antibiofilm est augmenté de manière proportionnelle au nombre de bactériophages présents dans le cocktail. Ceci permettrait également de prévenir l'apparition de mécanismes de résistance des bactéries contre les bactériophages.

Les virus en règle générale sont précis, spécifiques et sélectifs de certains récepteurs présents uniquement sur leur cible (Bono et al. 2021). C'est le cas des bactériophages et de leurs bactéries cibles. Contrairement aux antibiotiques, ils ont tendance à être spécifiques à la fois à l'espèce et à la souche. Les bactériophages infectent des souches particulières, même parmi une seule espèce bactérienne, bien que certains bactériophages puissent infecter plusieurs espèces (Pallavi et al. 2017). De ce fait, ils ne vont pas impacter le microbiote de l'hôte (l'être humain) qu'il faut protéger (Holger et al. 2021). En effet, les chercheurs découvrent de plus en plus d'informations qui consolident l'importance du rôle que joue le microbiote dans l'homéostasie du corps. Il peut être altéré et déséquilibré des suites d'un traitement antibiotique qui, de par son manque de spécificité, a pour effet des perturbations métaboliques ou immunitaires, menant par exemple au développement de l'obésité, au développement du diabète, etc. (Dąbrowska et al 2019). La compréhension actuelle concrète des dommages collatéraux dus à la phagothérapie est limitée. Cependant, comparé à l'antibiothérapie, la phagothérapie entraîne effectivement moins de perturbations du microbiote (Lin et al. 2017). Les bactériophages évoluent également avec les bactéries en les infectant continuellement et en acquérant des mutations qui leur permettront de continuer à les infecter : c'est une coévolution (Bono et al. 2021).

Les bactériophages sont essentiellement composés de protéines et d'acide nucléiques ce qui les rend non toxiques et donc peu propices à donner des effets secondaires au patient malade (Holger et al. 2021). Par ailleurs, aucun effet secondaire grave n'a été rapporté (Arumugam et al. 2018).

Le coût reste un avantage indéniable : les bactériophages sont présents partout à travers le monde et leur isolation est peu coûteuse comparée à la recherche et au développement de nouveaux antibiotiques (Aghaee et al. 2021). Ils sont considérés comme l'entité biologique la

plus abondante sur terre. Il y a, à ce jour, 1031 types de bactériophages différents (Zyman et al. 2022). Les eaux usées et les déchets hospitaliers sont des sources immédiates de bactériophages d'autant plus que les bactériophages ciblant les bactéries résistantes aux antibiotiques sont plus susceptibles de se trouver dans l'environnement du patient infecté. De plus, les coûts de purification et de production des bactériophages sont beaucoup moins onéreux que ceux des antibiotiques (Pallavi et al. 2017).

Comparé aux antibiotiques, il n'est pas nécessaire qu'il y ait une certaine concentration pour que les bactériophages soient actifs et il n'est pas possible de parler de concentration minimale inhibitrice car ce ne sont pas des molécules inertes mais bien des entités capables de se reproduire et de mener à bien l'infection des bactéries de manière exponentielle (Dąbrowska et al. 2021). En effet, les bactériophages ont également la capacité d'augmenter leur concentration in situ au site d'infection. Cela peut être très pratique, notamment afin d'obtenir un effet bactéricide. Même s'il est logique de penser aux bactériophages comme alternative aux antibiotiques dans le cadre d'infections résistantes, les phages pourraient également s'appliquer à des infections simples et non compliquées (Dąbrowska et al 2019).

Tous ces avantages sont très encourageants et ont permis la réalisation de nombreuses études sur l'efficacité de la phagothérapie sur *Pseudomonas aeruginosa*. Par souci de précision, les études présentées dans la partie suivante sont orientées sur les plaies chroniques, notamment les brûlures, colonisées par *Pseudomonas aeruginosa*. Aussi, nous allons explorer la voie d'administration topique des bactériophages, qui va de pair avec les infections cutanées.

4.2 LES PLAIES CHRONIQUES

La peau constitue une barrière protectrice pour les tissus sous-jacents du corps humain. Elle fournit une protection contre les microbes pathogènes, qui envahissent la peau, et contrôle la colonisation bactérienne. La perte d'intégrité de la peau par blessure mécanique entraîne la formation d'une plaie et expose les tissus sous-cutanés à l'environnement, ce qui conduit à la colonisation et à la prolifération microbienne (bactéries, champignons, parasites et virus). Les infections cutanées septiques sont principalement causées par des bactéries et sont signalées dans un tiers des infections contractées à l'hôpital chez les patients chirurgicaux et représentent 70 à 80 % de la mortalité. Les infections des plaies sont les principaux facteurs dans le

développement de la morbidité et de la mortalité chez les patients, surtout dans les pays en développement. Les plaies constituent un environnement de choix pour les bactéries, elles fournissent des conditions de croissance et de prolifération optimales : chaleur, humidité et nutriments. Les infections bactériennes chez les patients blessés sont fréquentes et difficiles à contrôler, en particulier dans le milieu hospitalier. Les plaies septiques, qui abritent de multiples bactéries pathogènes, sont fréquentes et peuvent conduire à une septicémie. (Pallavi et al. 2017).

Les infections bactériennes sont une complication fréquente et problématique de la cicatrisation des plaies. *Pseudomonas aeruginosa* fait partie des bactéries responsables. L'utilisation de la phagothérapie pour éradiquer les infections associées aux plaies montre un potentiel thérapeutique intéressant pour les applications cliniques. Plusieurs études ont été réalisées mais les résultats ne sont pas uniformes : certaines ont été efficaces et d'autres non. Il est donc important d'identifier les facteurs qui mènent au succès de la phagothérapie sur les plaies infectées. L'administration de titre élevé de phages par exemple entraîne majoritairement un succès de la phagothérapie même s'il a été démontré une efficacité d'une phagothérapie avec un faible titre (Zyman et al. 2022). Il a également été constaté que les cocktails de phages réduisaient de manière significative la charge microbienne des plaies et permettaient une cicatrisation plus rapide des tissus.

Dans l'étude de Pallavi et al. les bactériophages qui ont été isolés des eaux usées ont démontré une activité lytique parfaite contre les bactéries multirésistantes causant des plaies septiques. L'analyse in vitro des bactériophages isolés a démontré une lyse contre les bactéries MDR, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et ces phages isolés peuvent être prometteurs comme premier choix pour la prophylaxie contre la septicémie des plaies. Il a également été constaté que la phagothérapie n'empirait pas la multi-résistance chez les bactéries et pouvait fonctionner simultanément sur une grande variété de bactéries MDR lorsqu'elle est utilisée sous forme d'un cocktail de bactériophages. Par conséquent, les résultats de cette étude suggèrent que ces bactériophages pourraient être des options thérapeutiques potentielles pour le traitement des plaies septiques causées notamment par *P. aeruginosa*. Cette étude a révélé que 93 % des plaies positives pour la culture présentaient une croissance monomicrobienne et 7 % une croissance polymicrobienne. Parmi ces agents pathogènes isolés, *P. aeruginosa* était le plus présent principalement dans le total des isolats (22,6 %). Les bactériophages peuvent lyser les isolats bactériens MDR qui causent des plaies septiques. Les bactériophages ont une activité bactéricide contre les bactéries pathogènes responsables des maladies, et ils peuvent rapidement

réduire les charges bactériennes. À partir de ces résultats, il a été démontré que les bactéries MDR gram-positive (*S. aureus*) et les bactéries MDR Gram négatif (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*) obtenues à partir de plaies septiques étaient sensibles à la lyse des bactériophages (PA DP4, SA DP1, KP DP1 et EC DP3), et que ces phages méritaient une étude plus approfondie pour être optimisées dans des conditions *in vivo* en utilisant le modèle de souris approprié (Pallavi et al. 2017).

4.2.1 LE CAS DES BRÛLURES

Une brûlure est une « lésion de la peau ou des muqueuses provoquées par leur exposition à une chaleur intense ou par leur contact avec un agent physique ou chimique » (Larousse). Elles provoquent une brèche de la barrière cutanée protectrice et suppriment le système immunitaire de la zone ce qui permet l'établissement de bactéries, notamment de *Pseudomonas aeruginosa* (Bono et al. 2021). La colonisation par cette bactérie et sa prolifération rapide dans les tissus endommagés conduisent souvent à des infections disséminées, entraînant une bactériémie, un choc septique et des taux élevés de mortalité et de morbidité (McVay et al. 2007). Il a été estimé qu'au moins 50% de tous les décès causés par des brûlures sont le résultat d'une infection. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et prophylactiques pour le contrôle des infections bactériennes chez les patients atteints de brûlures est nécessaire (McVay et al. 2007). En effet, *Pseudomonas aeruginosa* joue un rôle de premier plan en tant qu'agent étiologique des infections graves chez les patients présentant des brûlures. Le problème du traitement de ces infections est la résistance et la capacité d'adaptation innée de *Pseudomonas aeruginosa*. La fréquence des infections de brûlures résistantes est devenue beaucoup plus fréquente. Les études suivantes qui vont être passées en revue sont réalisées à partir de brûlures infectée par *P. aeruginosa*.

ÉTUDE IN VITRO

Dans cette étude (Marashi et al. 2022), les chercheurs ont isolé des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* de plaies chroniques dues à des brûlures. C'est dans les eaux usées près des hôpitaux où se trouvent les patients qui ont été infectés, que les phages ont été prélevés. Les échantillons des différentes eaux usées ont été purifiés et ont passé le test de susceptibilité, c'est-à-dire le test où l'on va tester la sensibilité de la bactérie aux phages que

l'on compte utiliser. Dans ces échantillons, les chercheurs ont trouvé des phages capables d'infecter les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces phages ont tous été adsorbés par les bactéries en moins de 10min. Ce temps d'adsorption peut cependant être perturbé par la température corporelle, le pH, la densité bactérienne, etc. Ce qu'il est intéressant de noter est qu'il y a deux phages de la même famille (myoviridae queue contractile) et le troisième d'une autre famille (podoviridae queue non contractile). Les phages étaient tous actifs et stables à une température allant entre 4 et 50 degrés, ce qui prend en compte la température corporelle qui est d'environ 37 degrés. La gamme de pH où les phages avaient la meilleure performance se trouve entre 6 et 8, ce qui est idéal pour le pH physiologique. Les phages ont eu une activité bactéricide efficace contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette étude avait pour but de vérifier si les phages sont effectivement des antibactériens potentiellement efficaces dans la lutte contre les résistances aux antibiotiques classiques. Et la réponse s'est avérée affirmative bien qu'il soit important de pousser la recherche un peu plus dans le sens de la phagothérapie. Les eaux usées sont les meilleurs endroits de collecte de phages, surtout celles près des hôpitaux. Même si ici il y a deux familles de phages qui infectent *Pseudomonas aeruginosa*, il existe d'autres familles qui pourraient potentiellement aussi l'infecter : il n'y a pas encore de corrélation entre une certaine famille de phage et l'infection de *Pseudomonas aeruginosa*. D'où l'importance d'utiliser des cocktails de phage pour limiter les résistances : dans cette étude, le cocktail a éliminé 67,5% des souches de *P. aeruginosa*.

ÉTUDES IN VIVO

L'étude (McVay et al. 2007), a examiné la capacité des phages à prévenir les infections des plaies par *Pseudomonas aeruginosa*. Pour ce faire, des souris ont été blessées par une brûlure et certaines ont été soumises à une infection *Pseudomonas aeruginosa*. Elles ont toutes, blessées infectées comme blessées non infectées, reçu une dose unique de cocktail de phages (composé de 3 phages différents, $3,0 \times 10^8$ unités formant plaques (PFU) total) au moyen de trois voies d'administration différentes : la voie intramusculaire (i.m), sous cutanée (s.c) et la voie intrapéritonéale (i.p). Il existe néanmoins un groupe blessé et infecté qui n'a pas reçu de dose de phages. Toutes les souris brûlées qui n'ont pas été infectées mais qui ont reçu le cocktail de phage ont survécu. En l'absence de phage, il y a eu un taux de mortalité de 94 % chez les souris infectées blessées. Concernant la voie d'administration, lorsque les phages ont été administrés i.m. ou s.c., les taux de mortalité ont été réduits, respectivement, de 100% à 72 % et 78 %. C'est la voie i.p qui possède la meilleure réduction du taux de mortalité à 12%. Ces résultats démontrent que les phages administrés par voie parentérale ont significativement

augmenté la survie chez les souris infectées et blessées et que la protection relative variait selon les différentes voies d'administration : l'efficacité de la voie i.p. était supérieure à celle des voies i.m. ou s.c. La voie d'administration est donc particulièrement importante car cela a entraîné une différence d'efficacité. Les résultats ont montré qu'une dose unique du cocktail de phage pourrait réduire de manière significative la mortalité des souris infectées (6% de survie sans traitement contre 22 à 87% de survie avec le traitement à base de cocktail de phage). Il a été démontré que cette protection était le résultat d'une diminution significative du nombre d'organismes *Pseudomonas aeruginosa* trouvés chez les animaux traités avec succès, ce qui indique que les bactériophages utilisés ont été capables de localiser et de tuer *Pseudomonas aeruginosa* avant que l'animal ne succombe à une bactériémie et à un choc septique. La multiplication de ces phages a continué même après le décès des souris. Aucune souche de *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux phages n'a été retrouvée : cela suggère que l'utilisation d'un cocktail de phages contenant des phages qui utilisent différents récepteurs peut avoir empêché l'émergence de mutants résistants aux phages. Cependant, il a également été constaté que tous les animaux infectés qui ont ensuite été traités avec les phages n'ont pas survécu et que la voie d'administration des phages était particulièrement importante pour l'efficacité du traitement, la voie i.p. fournissant la protection la plus efficace. Par conséquent, les différences dans l'efficacité des différentes voies d'administration des phages peuvent être dues au taux et à la dose d'administration des phages à leurs cibles. Cette explication est quelque peu étayée par l'observation selon laquelle, contrairement aux phages administrés par les voies s.c ou i.m, les phages administrés par voie i.p., l'ont été plus tôt, à une dose plus élevée et pendant une période plus prolongée (McVay 2007).

L'étude Jault et al. 2019 aussi nommée « PhagoBurn » constitue un grand pas en avant concernant l'application de la phagothérapie sur des patients à une échelle plus grande qu'un case report, selon les normes en vigueur dans l'Union Européenne. Le but de cette étude était de vérifier si le cocktail de bactériophages fabriqué selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) était efficace sur des brûlures infectées. Cette étude est la première étude randomisée contrôlée à examiner la phagothérapie sous la surveillance de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicaments et des produits de santé (ANSM) en France, l'Agence Fédérale des Médicaments et Produits de Santé (AFMPS) en Belgique et le Swissmedic en Suisse, afin qu'elle soit réalisée selon les BPF et d'étude cliniques. L'objectif de cette étude était de s'assurer que les plaies chroniques infectées résistantes suite à une brûlure pouvaient être traitées par un cocktail de bactériophage. Pour ce faire, les chercheurs ont réalisé une étude

multicentrique, en double aveugle et randomisée. Les patients venaient de France et de Belgique et avaient plus de 18 ans. C'est chez ces patients que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée. Les femmes enceintes, allaitantes, et les patients ayant des comorbidités ou ayant eu des réactions au traitement initial ont été écartés de cette étude. Le cocktail a été établi à partir de 12 bactériophages lytiques de la famille des podoviridae et myoviridae. Le cocktail est appelé PP1131 et a été produit selon les BPF. Production : tampon phosphate NaCl, 10^9 bactériophage PFU/mL par vial. Ce cocktail a été conçu pour être appliqué par voie topique. Comme standard, les directeurs de l'étude ont choisi la sulfadiazine argentique comme comparateur, qui est le traitement de premier choix en cas de brûlure infectée. En effet, l'argent peut empêcher le fonctionnement des bactériophages donc lors du choix des patients à traiter, les chercheurs se sont assurés qu'ils n'avaient au préalable reçu que de la povidone iodée comme antibactérien sur la brûlure. Les deux traitements ont été administrés tous les jours pendant 7 jours et il y a eu un suivi post-traitement de 14 jours. Les résultats ont montré une réduction de la charge bactérienne des brûlures mais le délai d'obtention a été plus long que lorsque les brûlures ont été traitées avec la sulfadiazine argentique. Plusieurs causes sont possibles : d'abord, les groupes de traitement étaient déséquilibrés malgré la randomisation. En effet, les patients du groupe PP1131 étaient moins brûlés et plus âgés que ceux du groupe de soins standard. L'âge et la gravité des plaies brûlées sont tous deux des facteurs clés de risque de gravité des brûlures. La charge bactérienne était également plus élevée dans le groupe PP1131 que dans le groupe standard de soins. Il est aussi important de faire des tests de susceptibilité, c'est-à-dire des tests où l'on va tester la sensibilité de la bactérie au cocktail que l'on compte utiliser pour traiter la plaie infectée. Cela n'a pas été réalisé afin de simplifier le protocole et pour permettre un traitement rapide des patients infectés. Les chercheurs dans cette étude ont rencontré des problèmes de stabilité de leur cocktail : la dose de bactériophages administrée aux patients du groupe PP1131 était 1000 à 10 000 fois plus faible. Cette faible dose de bactériophage, combinée à la charge bactérienne élevée a entraîné une faible multiplicité de bactériophage sur le site de la plaie. De plus, la crème de sulfadiazine argentique a été appliquée directement sur les plaies sans aucune interface, tandis que le cocktail PP1131 a été appliqué via une base d'alginate : une possibilité de piégeage des bactériophages ne peut pas être exclue. Les complications septiques les plus graves, y compris le choc septique et les complications infectieuses, sont apparues deux fois plus fréquemment dans le groupe de soins standard que dans le groupe PP1131. Même si les progrès étaient plus lents dans le groupe PP1131 que dans le groupe témoin, une réduction cliniquement significative de la charge bactérienne a été observée dans le groupe des bactériophages, avec en plus, moins

d'événements indésirables graves observés chez les personnes traitées avec le cocktail de bactériophages que la norme de soins, ce qui indique un potentiel favorable de phagothérapie.

La formulation dans cette étude était liquide et la voie d'administration était topique. Il est donc intéressant d'en savoir un peu plus sur cette voie d'administration et les autres formulations disponibles qui pourraient mieux libérer les bactériophages au niveau de la plaie infectée.

4.2.2 VOIE D'ADMINISTRATION TOPIQUE

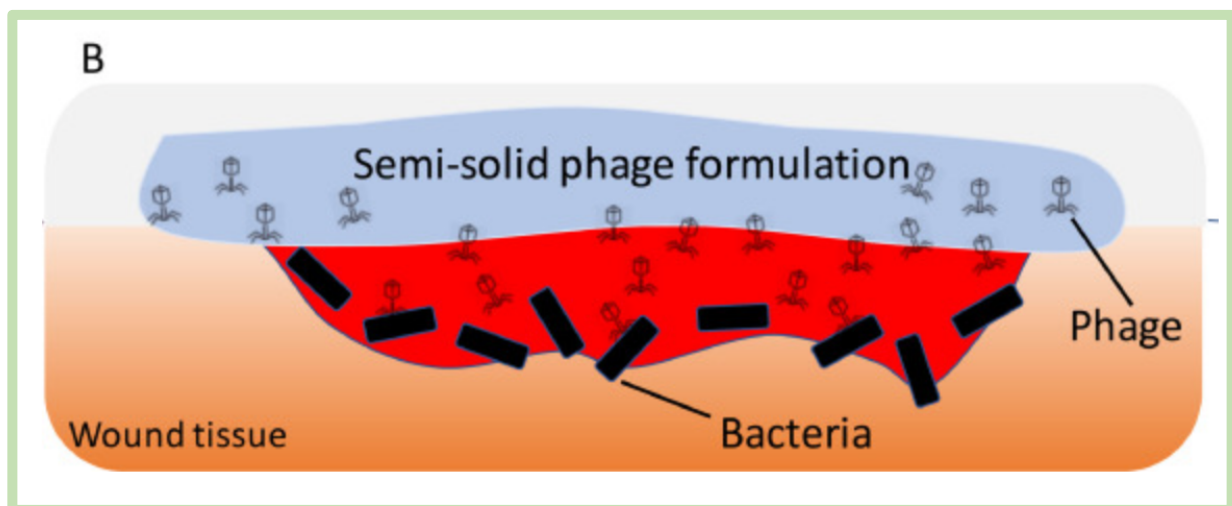
Actuellement, les formulations liquides constituent le moyen de choix pour administrer des bactériophages au site d'infection de la plaie : c'est une formulation basique et simple. Cependant, il y a très peu de rapports décrivant la stabilité à long terme des mélanges de bactériophages (cette stabilité oscille entre 1 et 2 ans maximum sous certaines conditions physico-chimiques). En général, les bactériophages sont formulés dans des solutions tamponnées stériles, comme par exemple la solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Bien que les formulations liquides contenant des bactériophages soient généralement considérées comme stables sous réfrigération, les conditions optimales de stockage semblent dépendantes des types de bactériophages présents dans la solution. Le stockage classique recommandé s'effectue entre 2°C et 8°C dans un endroit sec, protégé de la lumière pendant 18 à 24 mois. L'ajout d'ions Mg^{2+} et Ca^{2+} (10 mM chacun), favorise la stabilité des bactériophages pendant le stockage car ces ions interagissent avec les charges négatives de la surface des bactériophages, ce qui aide à leur stabilisation dans les systèmes tamponnés aqueux (Chang et al. 2020).

Il existe d'autres formulations, notamment semi-solides telles que les gels, les crèmes et les pommades qui sont également destinées à une application topique. Elles fournissent non seulement une protection et une hydratation de la peau, mais pourraient également servir de vecteur de bactériophages. Les formulations semi-solides sont faciles à appliquer et peu irritantes pour la peau. Comme certains bactériophages s'inactivent en présence d'alcool, les hydrogels par exemple sont un moyen intéressant de délivrer des bactériophages en raison de leurs propriétés hydrophiles (Zyman et al. 2022). Les bactériophages sont plutôt stables dans les hydrogels formulés avec des polymères non ioniques, car les polymères anioniques

provoquent rapidement une inactivation des bactériophages : à pH physiologique, la capside du bactériophage présente une charge négative et la queue a une charge positive, les polymères anioniques peuvent donc interagir avec les queues chargées positivement et bloquer les récepteurs dans les fibres de la queue qui sont responsables de la reconnaissance et de la liaison des bactéries (Chang et al. 2020).

En plus de la stabilité biologique des bactériophages, le véhicule de formulation doit rester stable pendant la durée de conservation. Les solutions aqueuses, les émulsions et les suspensions fournissent un environnement favorable à la croissance microbienne. Une méthode possible de production de formulations de bactériophages semi-solides stériles est le passage par autoclave ou la réalisation de ces formulations dans un milieu stérile. L'évaluation du profil de libération du bactériophage est très important car cela peut avoir un impact sur la fiabilité de l'efficacité du bactériophage (Chang et al. 2020).

Figure 6 Les formulations semi-solides appliquées aux phages (Chang et al. 2020)



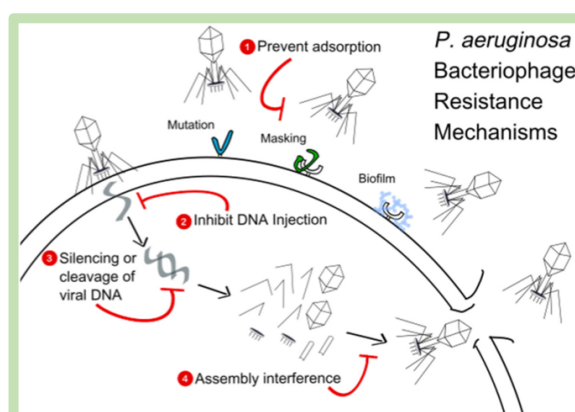
Il faut cependant noter que par exemple, 50% de la quantité de bactériophage appliquée de manière topique passe dans le sang. Cela peut altérer l'efficacité de la phagothérapie (Holger et al. 2021). D'autres facteurs peuvent influencer la phagothérapie et limiter son efficacité.

4.3 LIMITES DE LA PHAGOTHÉRAPIE

Bien que prometteuse, la phagothérapie présente plusieurs limites. Les bactériophages se lient à des récepteurs très spécifiques ce qui pourrait limiter l'efficacité de la phagothérapie si toutes les bactéries problématiques ne possèdent pas ces récepteurs. Cette particularité empêche donc la phagothérapie d'avoir un large spectre et cela peut donc entraîner une sélection de bactéries qui vont évoluer car elles ne possèdent pas le récepteur spécifique requis pour que le bactériophage puisse s'y fixer. Elles pourront donc échapper au virus et continuer leur croissance. Une solution qui existe déjà est d'utiliser ce que l'on appelle des « cocktails de phages » (Bono et al. 2021). En ne ciblant qu'un seul agent pathogène, la phagothérapie pourrait également être moins efficace contre les infections telles que les brûlures infectées, qui sont parfois colonisées par plus d'une souche de bactérie. Aussi, il n'est pas possible d'ignorer le fait que la spécificité des bactériophages est en majeure partie la raison pour laquelle il est complexe d'envisager une production et une distribution à grande échelle de bactériophages, comme c'est le cas avec les antibiotiques à large spectre (Lin et al. 2017). Cette grande spécificité rend également difficile la quête du bon bactériophage, auquel la bactérie va être sensible (Dąbrowska et al. 2019). Même si les réservoirs de bactériophages sont abondants, il est parfois difficile d'isoler les bons bactériophages qui seront efficaces contre la bactérie cible (Aghaee et al. 2021).

Il a aussi été prouvé que les bactéries sont capables d'évoluer dans le sens de la résistance contre les bactériophages (avec des mécanismes de défense comme par exemple les enzymes de restriction ou CRISPR-Cas): il n'est donc pas exclu qu'apparaisse une résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bactériophages (similaire à la résistance des bactéries aux antibiotiques) (Bono et al. 2021).

Figure 7 Mécanismes de résistance de Pseudomonas aeruginosa à l'encontre des phages (Holger et al. 2021)



De plus, il est difficile d'établir une efficacité d'un bactériophage donné contre une bactérie donnée. Pour que la phagothérapie puisse mieux se développer, il est essentiel de trouver un moyen d'associer les bactériophages avec leurs bactéries correspondantes rapidement. Il est aussi nécessaire de développer des bactériophages qui seront moins sélectifs afin qu'ils impactent une large gamme de bactéries : cette voie est déjà explorée avec le développement de « cocktail de phages » pour augmenter le spectre d'action de la phagothérapie (Bono et al. 2021).

Le phage idéal est un phage lytique, qui ne transfère pas d'ADN bactérien, qui ne code pour aucune toxine (facteur de virulence) et qui n'est pas susceptible à une résistance bactérienne, cela est très fastidieux à trouver (Bono et al. 2021).

Les bactériophages sont de grands complexes nucléotidiques, ce qui signifie qu'ils sont capables d'activer des réponses immunitaires. Ce paramètre est important à prendre en compte lors d'un traitement à base de bactériophages (Dąbrowska et al. 2019). In vivo, cela se traduit par l'activation des réponses immunitaires innées car certaines protéines présentes sur ces phages peuvent enclencher le recrutement des phagocytes qui vont se charger de détruire les bactériophages. Les réponses peuvent également être adaptatives avec la formation d'anticorps, surtout en cas de contacts répétés avec les bactériophages. Cela peut compromettre l'efficacité de la phagothérapie. L'intensité de la réponse immunitaire variera en fonction du type de bactériophage et de sa concentration. Une administration répétée est le meilleur moyen de favoriser la formation d'anticorps neutralisants dirigés contre les bactériophages (Romero-Calle et al. 2019). On doit donc trouver la dose idéale donc qui sera assez élevée pour tuer la bactérie et assez basse pour ne pas activer le système immunitaire (Aghaee et al. 2021), et éviter les applications prolongées ou répétées (Wittebole et al. 2014). La réponse immunitaire des bactériophages peut-être « négligeable » chez une personne immunocompétente mais ne peut l'être chez une personne immunodéprimée car les effets secondaires pourraient aggraver son état général (Lin et al. 2017).

Enfin, les antibiotiques et les bactériophages fonctionnent comme des antibactériens qui perturbent les colonies bactériennes par lyse ou inhibition, mais plusieurs différences clés rendent chaque antibactérien plus ou moins approprié selon la situation. Les effets indésirables aux antibiotiques sont bien documentés (par exemple la toxicité rénale ou hépatique) mais concernant les bactériophages, il y a peu d'effets secondaires rapportés pour l'instant. Cela est

en partie due au fait qu'il n'y ait pas d'utilisation de masse de ce produit. Notons également qu'une grande partie de l'information disponible sur la sécurité des bactériophages est récente, on n'y a donc pas assez de recul pour l'instant (Lin et al. 2017).

Bien que les limites soient nombreuses, il reste possible d'améliorer certains paramètres afin d'obtenir de meilleurs résultats, ce qui donne de nouvelles perspectives d'évolution de cette thérapie.

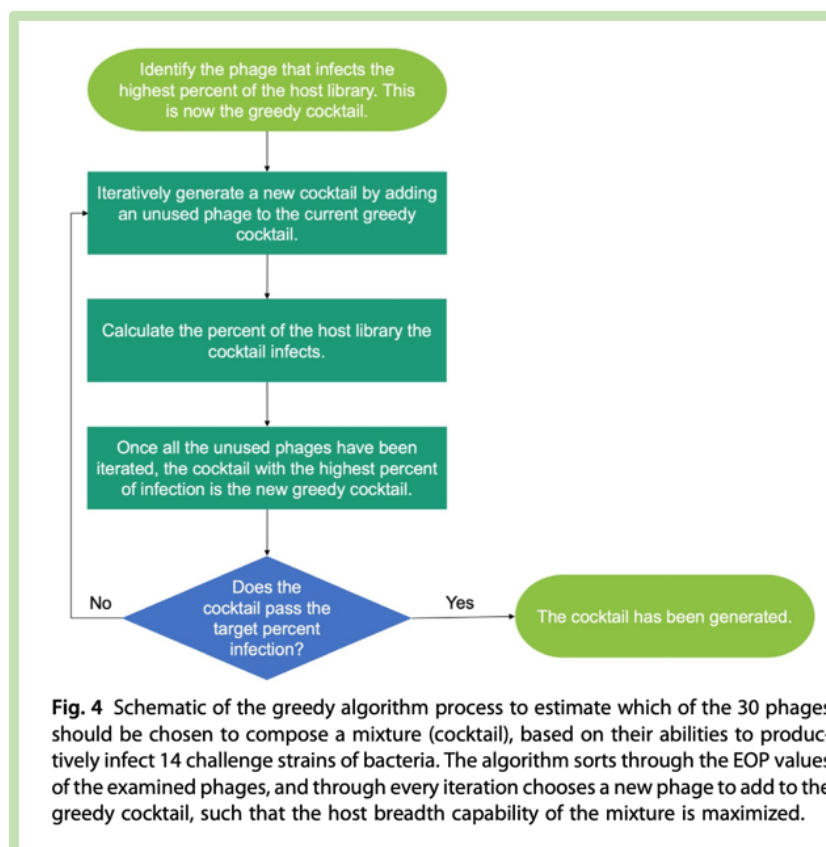
4.4 PERSPECTIVES

Dans la phagothérapie, la multithérapie par cocktail de bactériophages est plus souvent utilisée dans le but d'augmenter l'efficacité du traitement et de prévenir l'éventuelle résistance contre les bactériophages en question (Aghaee et al. 2021), un risque que possède la monothérapie (Holger et al. 2021). L'utilisation de ces cocktails peut aider à contrôler la population bactérienne si il n'y a aucune résistance. Le cocktail peut entrer dans le biofilm, détruire la biomasse et atteindre les bactéries coincées au centre du biofilm (Chegini et al. 2020). Les cocktails de bactériophages semblent être la solution miracle à tous les soucis rencontrés jusqu'à présent. Cependant, leur conception est beaucoup plus compliquée que la conception d'une antibiothérapie combinée car les bactériophages existent en abondance sur Terre. Qui dit abondance dit difficulté à trouver les bons bactériophages qui réuniront tous les critères requis pour être efficaces contre la souche de bactérie correspondante. La composition du cocktail de bactériophages est très importante car elle sera majoritairement responsable du succès du traitement. Même si le fait de composer des cocktails que l'on qualifierait de « personnalisés » prendrait beaucoup de temps et coûterait cher, cela reste la meilleure démarche à adopter étant donné la spécificité des bactériophages (Lin DM et al. 2017). Pour une phagothérapie efficace, le principe est d'administrer un cocktail de bactériophage dont on connaît le spectre, d'adapter sa composition ou non en fonction de l'efficacité, pour ensuite faire face à l'infection. Il faut faire attention au fait que les bactériophages peuvent entrer en compétition entre eux pour infecter la bactérie et donc biaiser l'efficacité d'un bactériophage donné (Bono et al. 2021).

Pour être plus concret, des études ont été réalisées afin de vérifier l'efficacité de la phagothérapie basée sur le principe de cocktail de bactériophages. Pour qu'un cocktail de

bactériophage soit efficace, il faut au moins deux bactériophages qui possèdent un spectre incluant la bactérie cible et au moins un bactériophage qui possède l'habilité de tuer la bactérie (Dąbrowska et al. 2019). Dans l'étude de Bono et al. 2021, 30 phages ayant une activité lytique et 14 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolés. Les résultats ont confirmé que la majorité des bactériophages ont pu infecter la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 qui avait été initialement utilisée pour amplifier les bactériophages. Cependant, certains bactériophages étaient plus sélectifs que d'autres concernant les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Il est important de noter que certains bactériophages sont naturellement capables d'infecter différents types de bactéries ce qui répond à la critique selon laquelle ils sont trop spécifiques. C'est la raison pour laquelle il est important de s'assurer que la bactérie responsable de l'infection que l'on souhaite traiter est sensible aux souches de bactériophages que l'on compte utiliser pour préparer notre cocktail. L'algorithme suivant est intéressant pour bien choisir les bactériophages lors de la composition d'un cocktail.

Figure 8 Exemple d'algorithme qui permet fabriquer des cocktails de bactériophages qui seront efficaces (Bono et al. 2021)



En dehors de la formulation de cocktails de phages, il existe d'autres facteurs qui pourraient optimiser l'efficacité de la phagothérapie afin qu'elle soit réussie dans la plupart des cas.

4.5 OPTIMISER L'EFFICACITÉ

Il existe des étapes importantes et nécessaires à réaliser afin de mener à bien la thérapie : caractériser les paramètres des bactériophages comme le temps d'adsorption, la latence, le point d'éclatement de la bactérie et l'affinité des bactériophages pour certains récepteurs de *Pseudomonas aeruginosa*. Il faut aussi effectuer des études en vue de détecter des bactériophages qui renforceraient la résistance et la virulence des bactéries en leur transmettant des gènes codant pour des toxines ou pour des résistances (Holger et al. 2021). Cela est primordial car l'objectif n'est pas d'exacerber l'infection dont souffre le patient. Aussi, le succès du traitement dépend de la tendance des bactériophages à se répliquer en présence de la bactérie cible : la vitesse de réplication du bactériophage doit excéder celle de la bactérie pour venir à bout de celle-ci (Aghaee et al. 2021).

Avant de commencer le traitement, il est important de vérifier que la bactérie est sensible au bactériophage donné. Pour ce faire, on réalise des tests de susceptibilité avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa* présente dans l'infection et plusieurs bactériophages différents. Afin d'assurer l'absence d'effets secondaires suite à l'injection de bactériophages, il faut que la solution contenant les bactériophages soit bien purifiée de toutes les endotoxines. Enfin, il est essentiel de s'assurer que les bactériophages utilisés n'encodent pas de facteurs de virulence (Dąbrowska et al. 2019).

Les critères de choix des bactériophages sont les phages non lysogéniques, qui n'encodent pas de gènes toxiques, qui ne transfèrent pas de gènes de bactéries en bactéries. L'utilisation de bactériophages non tempérés et lytiques aident à couvrir le maximum de ces caractéristiques. Dans la phagothérapie, il existe deux types de traitements : le traitement passif qui dépend uniquement de la quantité totale de bactériophage injectée au site d'infection et le traitement actif qui dépend de la quantité totale de virions produits au site d'infection après injection de la dose de bactériophage (Dąbrowska et al. 2021).

Les bactériophages représentent une alternative solide aux antibiotiques. Cependant, est-ce possible de combiner les deux lors d'un traitement ? Si oui, quels seront les effets ?

4.6 SYNERGIE DES ANTIBIOTIQUES ET DES PHAGES

Il existe une synergie entre bactériophages, mais aussi entre bactériophages et antibiotiques (Aghaee et al. 2021). En effet, les bactériophages sont capables d'augmenter la perméabilité du biofilm afin de le détruire : cela est utile car le biofilm représente l'une des raisons pour lesquelles les bactéries sont résistantes à l'antibiothérapie. Le fait de le rendre plus perméable aux antibiotiques serait bénéfique car les bactériophages vont potentialiser le passage de l'antibiotique à travers le biofilm. Mais attention, il faut garder en mémoire que lorsque les bactériophages détruisent la couche de polymères, les bactéries latentes qui se trouvent au centre du biofilm vont avoir accès à des ressources de nourriture et pouvoir se multiplier. Les bactériophages ont une meilleure performance contre le biofilm quand ils sont utilisés lors des premiers moments du biofilm en cocktail ou lors d'une thérapie combinée. Un exemple de thérapie combinée est l'association de ciprofloxacine/bactériophage/ceftazidime : elle réduit considérablement la densité bactérienne (Chegini et al. 2020). C'est la raison pour laquelle il peut être intéressant de combiner les bactériophages avec les antibiotiques. Cela a déjà été exploré.

Dans l'étude d'Engeman et al. le traitement combiné in vitro de bactériophages et d'antibiotique a entraîné une augmentation significative de la sensibilité des souches MDR aux antibiotiques. Le traitement par la ceftazidime, le meropenem, la gentamicine ou la ciprofloxacine en présence du bactériophage a augmenté le nombre de souches de *P. aeruginosa* sensibles à ces antibiotiques de 63 % (ceftazidime), 56 % (meropenem), 31 % (gentamicine) et 81 % (ciprofloxacine). In vivo, dans le cas de plaie avec comme modèle animal une souris, 7 souris traitées sur 8 traitées avec une combinaison de ceftazidime et de bactériophages (dans l'étude nommé PAM2H) pendant trois jours n'avaient plus aucune bactérie détectable dans leurs plaies au jour 4, tandis que toutes les souris traitées avec de la ceftazidime ou du PAM2H en monothérapie avaient 10^7 unités formatrices de colonies de *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* récupérée à partir des blessures de souris après le traitement combiné a montré une virulence réduite. Aussi, le séquençage de l'ADN a indiqué que le traitement combiné prévenait les mutations dans les

gènes codant pour des récepteurs de phages connus. Le traitement par PAM2H en association avec des antibiotiques a entraîné une resensibilisation de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques in vitro et une réduction synergique de la charge bactérienne in vivo (Engeman et al. 2021).

En résumé, l'association de bactériophages et des d'antibiotiques peut potentialiser la suppression du pathogène, améliorer la diffusion des bactériophages et des antibiotiques à travers le biofilm et peut également réduire le risque de développer des résistances. On ne peut cependant pas tout associer librement : par exemple la tétracycline, qui possède son action bactéricide/bactériostatique par inhibition de la synthèse de protéines dans les bactéries, peut interférer avec la production de bactériophage car ces derniers ont besoin de la machinerie génétique de la bactérie régulée à l'aide protéines. Ainsi il faut bien établir les combinaisons qui constitueront la thérapie combinée (Aghaei et al. 2021).

Nous sommes néanmoins en droit de nous demander comment serait-il possible de rendre plus accessible la phagothérapie ? Cela passerait par un processus de fabrication de bactériophages plus automatisé, mais est-ce possible ?

4.7 FABRICATION

Il existe certaines étapes à suivre afin que tous les produits à base de bactériophages soient approuvés par l'European Medicine Agency (EMA). Les critères d'inclusion de la fabrication pour les phages candidats sont les suivants (Tanir et al. 2021).

Il est primordial de connaître le nombre de phages nécessaire afin d'obtenir un traitement efficace, de minimiser le nombre total de phages et le nombre total d'hôtes de production nécessaire tout en maintenant l'efficacité clinique du traitement. Il faut également connaître la puissance du bactériophage candidat médicamenteux : cette puissance se traduit par des paramètres tels que le temps de lyse de la bactérie et de la taille d'éclatement. La taille d'éclatement de la bactérie est un paramètre lié à la quantité de nouveaux virions produits : plus il y aura de nouveaux bactériophages au sein de la bactérie, plus la violence à laquelle celle-ci va éclater sera élevée, entraînant une grande taille de l'éclat ou non après la lyse de la bactérie. Aussi, différentes concentrations de phages doivent être testées sur une certaine concentration d'hôtes donnée et le moment de la lyse doit être mesuré. Le temps de lyse le plus court et le

taux d'infection plus élevé conduisent à un rapport phage/bactérie plus élevé. Il faut également prendre en compte la densité de l'hôte : certains bactériophages ne montrent une réplication qu'à une certaine densité d'hôte, il faut donc connaître la densité requise avant que les bactériophages ne soient introduits dans un bioréacteur. Les bactéries ayant un taux de croissance plus élevé induisent une taille d'éclatement plus élevée dans les phages et la réplication de l'hôte au taux de croissance maximal induit la taille d'éclatement la plus élevée. Par conséquent, après détermination de la densité de l'hôte pour la croissance, le taux de croissance maximal peut être déterminé si une grande taille d'éclatement est souhaitée (Tanir et al. 2021).

Tous les hôtes de production bactérienne doivent être testés et exempts de bactériophages contaminants. Il est essentiel de déterminer la pureté et l'identité de l'échantillon de la banque maitresse de bactériophages afin de déterminer si des mutations se sont produites lors de la construction d'une banque mère de bactériophages. De même, il faut mesurer avec précision la concentration et la viabilité des bactériophages à chaque étape. Une méthode populaire mais difficile à contrôler pour déterminer le nombre de phages est connue sous le nom de dosage de plaque à double couche. Cette méthode repose sur la capacité des phages à lyser les bactéries et à former des plaques visibles pour ensuite déterminer l'unité PFU (Plaques formant unités) (Tanir et al. 2021).

Concernant le stockage, si ce dernier est à court terme, la température de 4 degrés est suffisante pour 1 an avec des excipients communs pour les phages purifiés ou même avec du lysat brut. Si on ajoute du glycérol à 50% v/v, la durée de conservation peut aller jusqu'à 2 ans. Notons bien que la température de 4 degrés ne protège pas entièrement les phages de la dégradation. L'effet de la température est très variable : elle affecte la fixation du phage à son hôte, la pénétration du matériel génétique des phages et leur amplification, et le temps de latence. La température idéale efficace varie en fonction du type de phage. La réplication des phages dans le contexte de fabrication est déterminée par trois paramètres principaux : la constante d'adsorption (qui correspond à la vitesse à laquelle les bactériophages se fixent à la bactérie), le temps de latence (qui est le temps entre la fixation du bactériophage et la lyse de la bactérie) et la taille de l'éclatement (qui correspond au nombre de bactériophage libérés par une bactérie). Il y a aussi des paramètres non négligeables comme la température, le pH, l'environnement (Tanir et al. 2021).

Concernant les phages, plus ils se répliquent et plus les chances d'avoir des mutations seront élevées. Cela nécessite de limiter la durée du processus à un certain temps afin d'éviter que de grandes quantités de mutations ne s'accumulent. La composition des milieux de phages est importante. Elle affecte l'adsorption des phages et l'état physiologique bactérien. Cependant, elles possèdent des composés organiques qui peuvent produire des contaminants et prolonger le temps nécessaire à la séparation et à la purification des phages (Tanir et al. 2021).

Dans les productions de bactériophages à usage médicinal, la stabilité génétique de l'hôte est cruciale. Si les bactéries hôtes subissent des mutations spontanées au cours du processus de fabrication, elles peuvent devenir résistantes aux bactériophages d'intérêt ou ceux-ci peuvent différer de la structure de phage finale souhaitée : cela peut entraîner des changements dans la fonction, la productivité et le rendement. Par exemple, les bactériophages qui possèdent un dsDNA ont des taux de mutations spontanées plus élevés que les autres types de phages. Pour éviter tout cela, il faut minimiser le nombre de cycles d'infection tout en maximisant le rendement, cela représente un challenge. Un nombre optimal de cycles de répllication des phages doit être déterminé pour le phage d'intérêt et la production doit être conçue en prenant en compte tout cela. Chaque phage ayant une répllication différente, le nombre de cycles de répllication sans changement significatif dans le génome sera différent pour chaque phage (Tanir et al. 2021).

Il existe différents modes de production de phages. Le procédé par lot par exemple : l'infection par les phages se produit dans le même fermenteur où la croissance bactérienne se produit. C'est le mode de fabrication le moins cher. Avant les procédures de préformulation, le lysat brut doit être purifié et les phages capturés et concentrés. Après la lyse cellulaire, les phages peuvent être collectés en ajoutant un tampon directement au lysat. Ceci sert à les isoler. Le lysat brut peut être traité par centrifugation, précipitation ou séparation du gradient de densité. Une méthode de purification courante est la précipitation de polyéthylène glycol ou la centrifugation du gradient de chlorure de césium ou la filtration (les membrane de 0,45 microgrammes afin d'éliminer les bactéries, les matériaux indésirables) (Tanir et al. 2021).

Une grande partie du processus de formulation des phages a été une adaptation de ce qui est déjà connu pour les thérapies à base de protéines. Il faut assurer la meilleure livraison des phages à leur site cible. Le processus de formulation doit être soigneusement évalué lors de la conception du procédé, car les pertes de rendement sont inévitables. La formulation va varier en fonction de la forme finale souhaitée : solide, semi solide, liquide. Les phages sont des entités

protéiques et leur nature les rend intrinsèquement sensibles aux conditions environnementales. Les plus critiques à prendre en compte pour la formulation d'un produit biopharmaceutique sont la température, le pH, la résistance ionique, l'adsorption sur les matrices et la contrainte de cisaillement. Il est important de noter que la morphologie des phages varie considérablement entre les différents phages et peut donc avoir des propriétés physico-chimiques différentes et distinctes lors de l'élaboration d'une formulation (Moraes de Souza et al. 2021).

Dans le cadre d'une phagothérapie, il est important de prendre en considération les propriétés physico-chimiques du ou des phages en question. Les formulations liquides sont les plus simples et disponibles pour l'administration des phages thérapeutiques. Les phages ont tendance à être stables dans des solutions liquides qui offrent un contrôle de pH et des ions libres tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} . La forme liquide est idéale pour l'administration per os mais qui se confronte comme tout autre médicament au pH faible de l'estomac. Une des solutions possibles seraient par exemple d'encapsuler les phages dans un liposome, des sphères formées par une bicouche lipidique, dans le but de protéger les phages de l'acidité gastrique.

Comme formes semi-solides on a les crèmes, les gels, pommades, pâtes ou les aérosols. La phagothérapie topique peut aider au traitement d'un certain nombre d'infections cutanées notamment l'acné, les plaies infectées. Par exemple pour que les phages soient stables, il faut utiliser des crèmes ayant une base non ionique. Le contrôle qualité peut être réalisé via PCR, ELISA ou typage de séquence multilocus.

L'AFMPS en Belgique a donné des conseils positifs sur l'utilisation des bactériophages comme ingrédients pharmaceutiques actifs dans les préparations magistrales produites par des pharmacies hospitalières depuis janvier 2018. Dans les pays de l'Europe de l'est, la phagothérapie fait partie intégrante de la médecine conventionnelle. Les préparations sont le plus souvent produites sous forme de liquide que l'on conserve à 4°C. L'étude de Duyvejonck et al. a testé les conditions de stabilité et de stockage de 4 phages notamment de PNM et 14/1 qui sont des phages qui infectent *Pseudomonas aeruginosa*, en vue de les utiliser pour d'éventuelles préparations magistrales en pharmacie hospitalière. Les résultats ont été satisfaisants : leur infectiosité est restée intacte lorsque ces phages étaient conservés dans une solution de PBS sans ions calcium ni magnésium. PNM a été inactivé immédiatement après dilution dans 5% de glucose tandis que 14/1 a résisté (Duyvejonck et al. 2021). Dans un essai récent randomisé (PHAGOBURN par Jault et al. 2019), l'étude a été un échec, notamment à cause de la perte de stabilité des cocktails de phages qui pourtant ont été fabriqués selon les

BPF. Une des causes de la perte de stabilité était liée au dosage : le cocktail était initialement dosé à 6 log PFU/mL et possédait au moment de l'étude seulement entre 1 à 2 log PFU/mL. En règle général, le titre idéal doit être compris entre 6 à 9 log PFU/mL pour être stable et efficace. Cela est à prendre en compte pour produire un produit biopharmaceutique à base de phages efficace.

Il existe des produits dérivés de bactériophages, notamment les endolysines qui ont le pouvoir de dissoudre les biofilms en général. Ces enzymes seules seraient-elles suffisantes comme alternatives aux antibiotiques dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* ?

5 LES ENDOLYSINES COMME ALTERNATIVE

Au cours de leur fixation à la paroi de leurs hôtes, les bactéries produisent ce que l'on appelle des substances polymères extracellulaire (EPS) qui vont former le biofilm. Ce réseau de polymères composé d'exopolysaccharides, d'acides nucléiques, de protéines et de lipides assurent une stabilité et confère un environnement idéal pour les bactéries. Cette matrice va limiter la diffusion des antibactériens dans le biofilm. L'importance des endolysines évolue proportionnellement avec la résistance des bactéries aux antibiotiques. Les endolysines sont des enzymes qui sont produites par les bactériophages afin d'hydrolyser la paroi cellulaire, plus précisément le peptidoglycan de la bactérie hôte et permettent donc de tuer la bactérie et de libérer la descendance de nouveau bactériophages nouvellement assemblés. Il existe plusieurs types d'endolysines : les acétylmuramidases, les transglycosylases, les glucosaminidases, les amidases et les endopeptidases. Il existe différents types d'endolysines suivant le type de bactérie : les endolysines possédant une configuration modulaire pour les bactéries gram positives et celles possédant une configuration globulaire pour les bactéries gram négatives.

C'est le fait de perturber la configuration des peptidoglycans qui entraîne la destruction des cellules bactériennes. Les endolysines sont un groupe important de protéines lytiques de bactériophages qui assurent la médiation des deux processus critiques essentiels au cycle de vie du bactériophage : la lyse de l'intérieur (qui consiste à libérer les phages de la cellule hôte) et la lyse de l'extérieur. Ces enzymes sont produites pour libérer la progéniture du bactériophage initial. Les transcriptions de l'endolysine sont effectuées par les facteurs de transcription de l'hôte. Au-delà de la théorie, des études, notamment celle de Guo et al. 2017 ont prouvé l'efficacité (la capacité à perturber le biofilm) des endolysines contre *Pseudomonas aeruginosa*. Il existe des endolysines recombinées sur le marché pour combattre les infections à bactéries gram positives mais également gram négative multi-résistantes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. Ce biopharmaceutique s'appelle Artilysin® (Abdelrahman et al. 2021). L'artilysine est une protéine de fusion composée d'une lysine fusionnée à un peptide déstabilisant. Elle est fabriquée en fusionnant le peptide myéloïde antimicrobien de mouton et l'endolysine KZ144 fabriqué par LYSANDO.

Les cellules persistantes sont des cellules en étant de dormance au sein du biofilm et qui sont particulièrement résistantes. Si celles-ci venaient à être libérées, elles pourraient redémarrer l'infection. Ces cellules posent un réel problème quant à l'éradication du biofilm :

plus on le disperse, plus il va libérer ces cellules et si elles ne sont pas sensibles aux antimicrobiens présents, elles vont sortir de leur dormance et commencer à se reproduire. Il n'est donc pas prudent d'envisager une monothérapie d'endolysine. De plus, on ne peut exclure une possible réduction de l'activité des endolysines à cause du système immunitaire. En effet, comme tous les biopharmaceutiques, on s'attend à une éventuelle immunogénicité entraînant une perte d'efficacité du médicament ou dans le pire des cas des hypersensibilités. Les endolysines restent néanmoins intéressantes : elles traitent sélectivement des espèces ou des sous espèces spécifiques de bactéries pathogènes sans perturber le microbiote comme les bactériophages au final. Elles ne vont cependant pas avoir la capacité de transférer des gènes de résistance de bactéries ou des toxines bactériennes. Il existe évidemment des possibilités de synergie entre les endolysines et les antibiotiques (Thumeeapak et al. 2016). En effet, cette étude a démontré que le traitement combiné d'endolysine (LysAPB-01) et de colistine en vue de traiter une infection à *Acinetobacter baumannii* a été un succès avec l'augmentation significative de l'activité bactérienne avec un taux d'inhibition allant jusqu'à 100% et une baisse de la concentration minimale inhibitrice de la colistine.

6 CONCLUSION

La phagothérapie n'est pas une découverte récente, elle existe depuis longtemps mais l'intérêt qui lui est porté s'intensifie car elle possède un potentiel curatif, comme nous l'avons vu. Au fil de cette analyse, nous nous rendons compte que cette thérapie qui représente un espoir dans la lutte contre la résistance bactérienne est exigeante, spécifique et fragile. En effet, il faut réaliser un cocktail de phages pour que la phagothérapie puisse fonctionner de manière optimale mais il faut bien choisir les souches de bactériophages qui vont être dans le cocktail donné. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* issues de l'infection doivent être sensibles aux bactériophages présents dans le cocktail, il faut donc faire des tests de susceptibilité au préalable de la production du cocktail. Une fois les bonnes souches de bactériophages choisies, il faut les purifier de toute substance autre que les bactériophages d'intérêt. Il faudra ensuite bien choisir la composition de la solution, le bon pH et la bonne température à laquelle les phages devront être conservés, sinon ils peuvent s'inactiver. Même lors de leur application sur des plaies chroniques par exemple, ils peuvent ne pas pouvoir quitter leur véhicule pour atteindre la bactérie ou s'ils y arrivent, ils peuvent être inactivés par celle-ci. Étant un produit biopharmaceutique qui est capable de se répliquer in vivo, il est difficile d'établir les concentrations idéales comme on le ferait dans la pharmacologie d'autres médicaments classiques. De plus étant un complexe de protéines, on ne pourrait négliger la capacité des bactériophages à déclencher des réactions immunitaires. Tous ces éléments peuvent être décourageants. Néanmoins ce n'est pas une solution à exclure car bien qu'elle soit fastidieuse, elle peut être efficace. Sa spécificité permet de protéger notre microbiote. Il est rassurant de se rendre compte que même dans le cadre d'une phase critique de résistance bactérienne menant à l'émergence de bactéries multirésistantes comme *Pseudomonas aeruginosa*, il existe d'autres possibilités à explorer. Il faut donc concentrer les recherches dans le but de rendre la phagothérapie efficace, disponible et accessible. Il serait intéressant de l'intégrer dans notre médecine conventionnelle. Mais au préalable, il faudrait se pencher sur plusieurs paramètres afin de les maîtriser, de créer un algorithme et par la suite un automatisme pour pouvoir traiter n'importe quelle infection. Cela représente évidemment un grand défi mais il est nécessaire de le relever pour faire face à cette crise de résistance bactérienne. Notons également que ce n'est pas la seule alternative qu'il est possible de développer comme nous l'avons vu avec les endolysines.

7 BIBLIOGRAPHIE

Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, Khan FM, Ayobami A, Adnan F, Torrents E, Sanmukh S, El-Shibiny A. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics* (Basel). 2021 Jan 28;10(2):124. doi: 10.3390/antibiotics10020124. PMID: 33525684; PMCID: PMC7912344.

Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *MBio*, 9(3), e02331-17.

Aghaee BL, Khan Mirzaei M, Alikhani MY, Mojtahedi A, Maurice CF. Improving the Inhibitory Effect of Phages against *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Burn Patient Using a Combination of Phages and Antibiotics. *Viruses*. 2021 Feb 21;13(2):334. doi: 10.3390/v13020334. PMID: 33670028; PMCID: PMC7926668.

Arumugam, S. N., Rudraradhya, A. C., Sadagopan, S., Sukumaran, S., Sambasivam, G., & Ramesh, N. (2018). Analysis of susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and isolation, characterization of lytic bacteriophages targeting multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(2), 1105-1117.

Bono, L. M., Mao, S., Done, R. E., Okamoto, K. W., Chan, B. K., & Turner, P. E. (2021). Advancing phage therapy through the lens of virus host-breadth and emergence potential. *Advances in virus research*, 111, 63-110.

CBIP <https://www.cbip.be/fr/start> consulté le 3 septembre 2021

Chang, R. Y. K., Morales, S., Okamoto, Y., & Chan, H. K. (2020). Topical application of bacteriophages for treatment of wound infections. *Translational Research*, 220, 153-166.

Chegini, Z., Khoshbayan, A., Moghadam, M. T., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1-17

Dąbrowska K, Abedon ST. Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies.

Microbiol Mol Biol Rev. 2019 Oct 30;83(4):e00012-19. doi: 10.1128/MMBR.00012-19. PMID: 31666296; PMCID: PMC6822990.

Dąbrowska, K., Górski, A., & Abedon, S. T. (2021). Bacteriophage pharmacology and immunology. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, 295-339.

Danis-Włodarczyk, K., Dąbrowska, K., & Abedon, S. T. (2021). Phage therapy: the pharmacology of antibacterial viruses. *Current Issues in Molecular Biology*, 40(1), 81-164.

Dictionnaire Larousse <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/brûlure/11499> / Consulté le 3 mai 2022

Dictionnaire médical de l'Académie Nationale de Médecine (version 2021). Infections(nosocomiale) définition. <https://dictionnaire.academie-medecine.fr/index.php?q=nosocomiale%20%28infection%29> Consulté le 5 mai 2021

Diggle SP, Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (Reading)*. 2020 Jan;166(1):30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860. Erratum in: *Microbiology (Reading)*. 2021 Aug;167(8): PMID: 31597590; PMCID: PMC7273324.

Duyvejonck H, Merabishvili M, Vaneechoutte M, de Soir S, Wright R, Friman VP, Verbeken G, De Vos D, Pirnay JP, Van Mechelen E, Vermeulen SJT. Evaluation of the Stability of Bacteriophages in Different Solutions Suitable for the Production of Magistral Preparations in Belgium. *Viruses*. 2021 May 8;13(5):865. doi: 10.3390/v13050865. PMID: 34066841; PMCID: PMC8151234.

Engeman E, Freyberger HR, Corey BW, Ward AM, He Y, Nikolich MP, Filippov AA, Tyner SD, Jacobs AC. Synergistic Killing and Re-Sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics by Phage-Antibiotic Combination Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Feb 25;14(3):184. doi: 10.3390/ph14030184. PMID: 33668899; PMCID: PMC7996583.

Guo M, Feng C, Ren J, Zhuang X, Zhang Y, Zhu Y, Dong K, He P, Guo X, Qin J. A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2017 Feb 27;8:293. doi: 10.3389/fmicb.2017.00293. PMID: 28289407; PMCID: PMC5326749.

Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., ... & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological research*, 212, 38-58.

Holger, D., Kebriaei, R., Morrisette, T., Lev, K., Alexander, J., & Rybak, M. (2021). Clinical Pharmacology of Bacteriophage Therapy: A Focus on Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Antibiotics*, 10(5), 556.

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., ... & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35-45.

Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017 Aug 6;8(3):162-173. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162. PMID: 28828194; PMCID: PMC5547374.

Lin, Y. W., Chang, R. Y., Rao, G. G., Jermain, B., Han, M. L., Zhao, J. X., ... & Li, J. (2020). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antipseudomonal bacteriophage therapy in rats: a proof-of-concept study. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(9), 1229-1235

Marashi, S. M. A., Nikkhahi, F., Hamed, D., & Shahbazi, G. (2022). Isolation, Characterization and in vitro Evaluation of Specific Bacteriophages Targeting Extensive Drug Resistance Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Septic Burn Wounds. *Infection & Chemotherapy*, 54(1), 153-164.

McVay, C. S., Velásquez, M., & Fralick, J. A. (2007). Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 1934-1938.

Moraes de Souza C, Tanir T, Orellana M, Escalante A, Koeris MS. Manufacturing Bacteriophages (Part 2 of 2): Formulation, Analytics and Quality Control Considerations. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021 Sep 2;14(9):895. doi: 10.3390/ph14090895. PMID: 34577595; PMCID: PMC8467454.

OMS (2017, Février 27). L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who->

[publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](#) Consulté le 5 mai 2021.

Pallavali RR, Degati VL, Lomada D, Reddy MC, Durbaka VRP. Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. PLoS One. 2017 Jul 18;12(7):e0179245. doi: 10.1371/journal.pone.0179245. PMID: 28719657; PMCID: PMC5515400.

Romero-Calle D, Guimarães Benevides R, Góes-Neto A, Billington C. Bactériophages comme alternatives aux antibiotiques dans les soins cliniques. *Antibiotiques (Bâle)*. 2019;8(3):138. Publié le 4 sept. 2019 doi:10.3390/antibiotics8030138

Soares, A., Alexandre, K., & Etienne, M. (2020). Tolerance and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 11, 2057.

Tanir T, Orellana M, Escalante A, Moraes de Souza C, Koeris MS. Manufacturing Bacteriophages (Part 1 of 2): Cell Line Development, Upstream, and Downstream Considerations. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 17;14(9):934. doi: 10.3390/ph14090934. PMID: 34577634; PMCID: PMC8471501.

Thi, Minh T.T., David Wibowo, and Bernd H.A. Rehm. 2020. "*Pseudomonas aeruginosa* Biofilms" *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 22: 8671.

Thummeepak, R., Kitti, T., Kunthalert, D., & Sitthisak, S. (2016). Enhanced antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01 endolysin (LysABP-01) in combination with colistin. *Frontiers in microbiology*, 7, 1402.

Xavier Wittebole, Sophie De Roock & Steven M Opal (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens, *Virulence*, 5:1, 226-235, DOI: [10.4161/viru.25991](#)

Pseudomonas aeruginosa fait partie des pathogènes préoccupants selon l'OMS. En effet, cette bactérie possède une résistance naturelle aux antibiotiques et commence à être résistante à l'arsenal thérapeutique restant. Cela est en partie dû à la capacité que possède cette bactérie à former un biofilm et la transmission horizontale et verticale de gènes de résistance aux antibiotiques. La phagothérapie représente dans ce cadre une option à explorer car elle peut se montrer efficace, notamment dans le traitement des plaies chroniques colonisées par *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, il existe plusieurs facteurs à prendre en compte pour que la phagothérapie soit une réussite : la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* face aux souches de bactériophages choisies, la formulation d'un cocktail de bactériophages, la stabilité de ceux-ci dans le cocktail au cours du temps, la quantité de bactériophages nécessaire etc... Il faut donc approfondir les recherches dans le but de maîtriser ces facteurs, afin de rendre la phagothérapie plus accessible et plus disponible. Cela représente un grand défi qu'il est nécessaire de relever pour pouvoir faire face à cette crise de résistance bactérienne.

Pseudomonas aeruginosa is one of the pathogens of concern according to the WHO. Indeed, this bacterium has a natural resistance to antibiotics and is beginning to be resistant to the remaining therapeutic arsenal. This is partly due to the ability of this bacterium to form a biofilm and the horizontal and vertical transmission of antibiotic resistance genes. In this context, phage therapy represents an option to be explored because it can be effective, particularly in the treatment of chronic wounds colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. However, there are several factors to pay attention to for phage therapy to be successful: the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to the strains of bacteriophages chosen, the formulation of a cocktail of bacteriophages, the stability of these in the cocktail during time, the quantity of bacteriophages required, etc. Further research is therefore needed in order to control these factors in an effort to make phage therapy more accessible and more available. This represents a great challenge that must be taken up for the purpose of facing this crisis of bacterial resistance.

Université de Namur | Faculté de Médecine | Département de Pharmacie
Rue de Bruxelles, 61 | 5000 Namur | Belgique

www.unamur.be/medecine/etudes-pharmacie