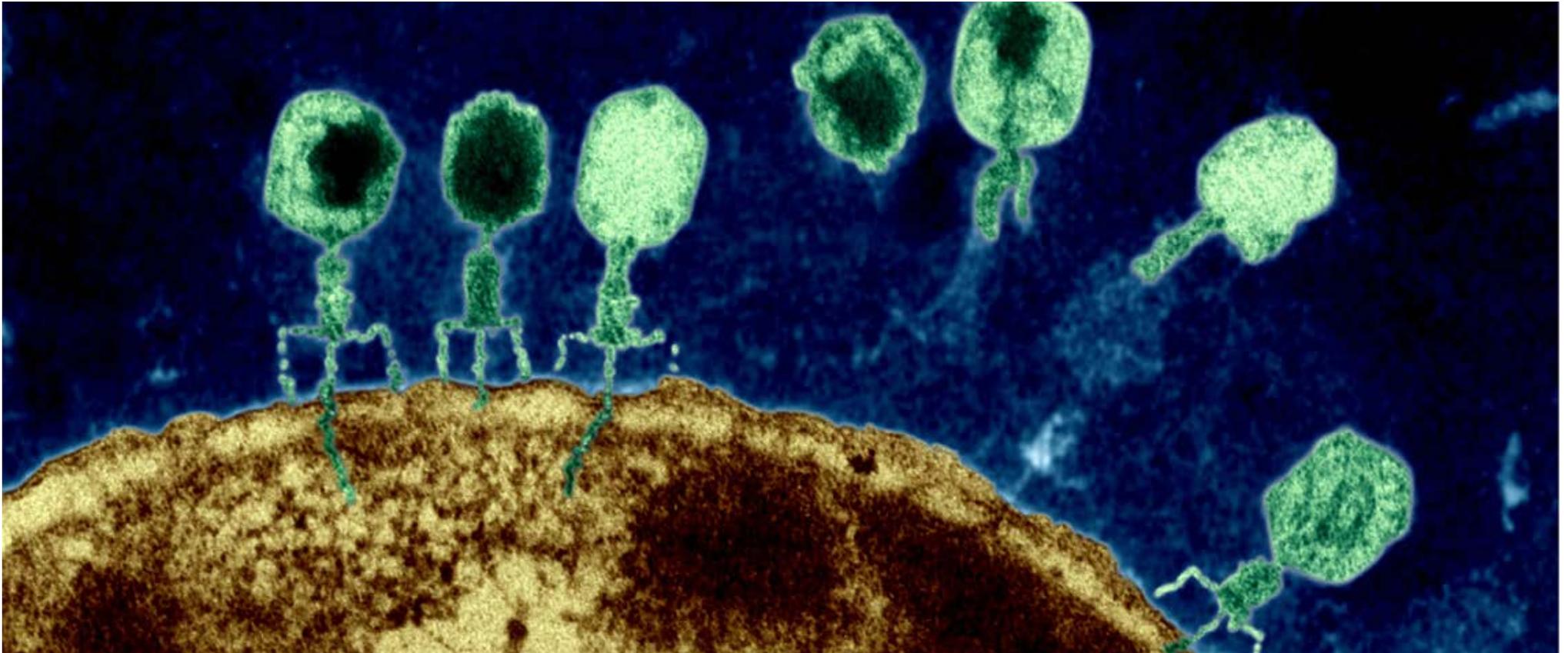


# Les Bactériophages en alternative à l'antibiothérapie



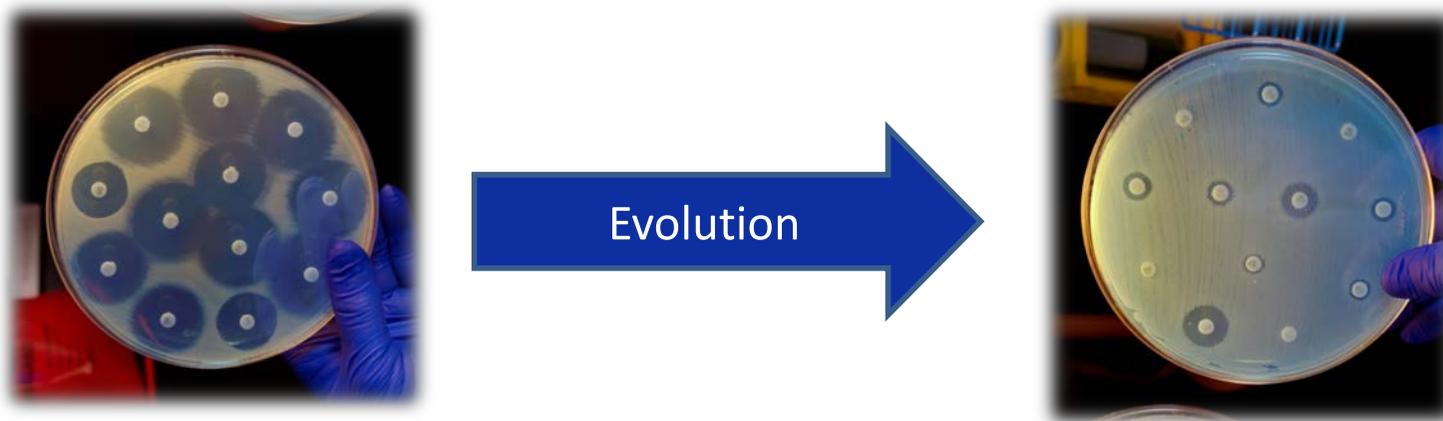
# Les bactériophages...

## ① Pourquoi ?



# Pourquoi ?

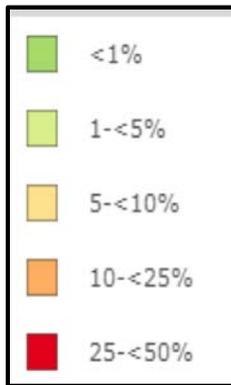
- La résistance bactérienne aux antibiotiques est une évolution normale... elle progresse...



- ... plus vite que l'apparition de nouveaux antibiotiques susceptibles de la contenir pendant quelques temps...

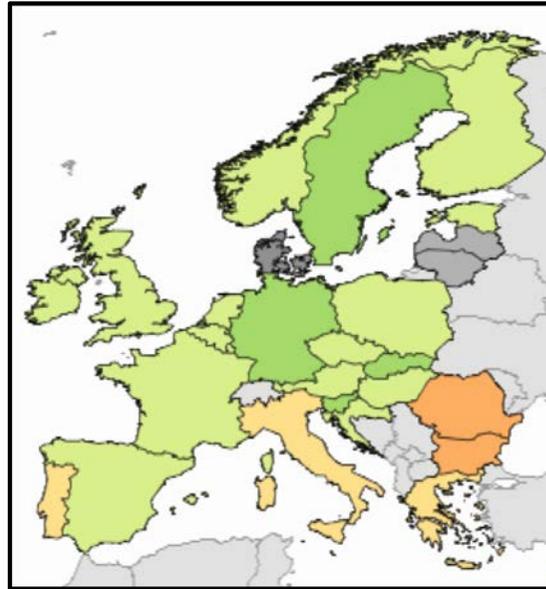
# Antibiorésistance - *E. coli*

Résistance (R+I) aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération

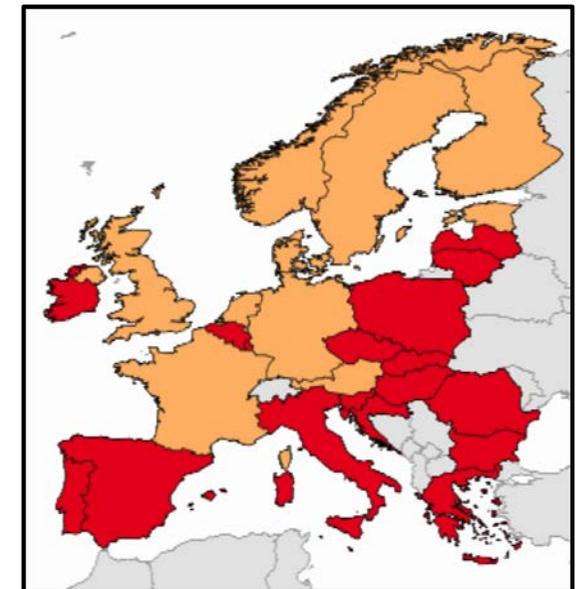
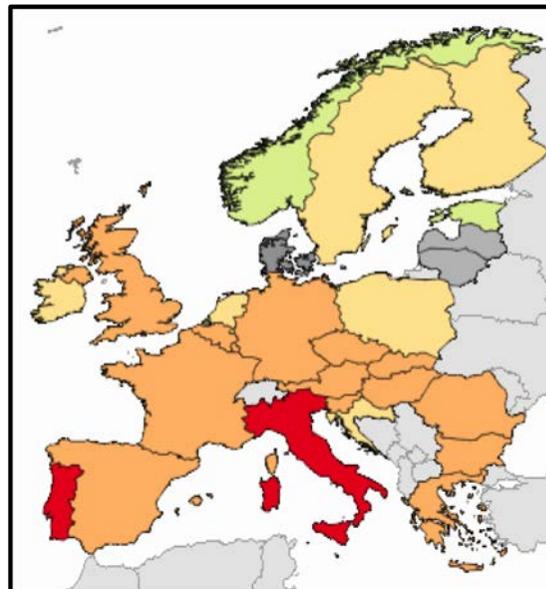
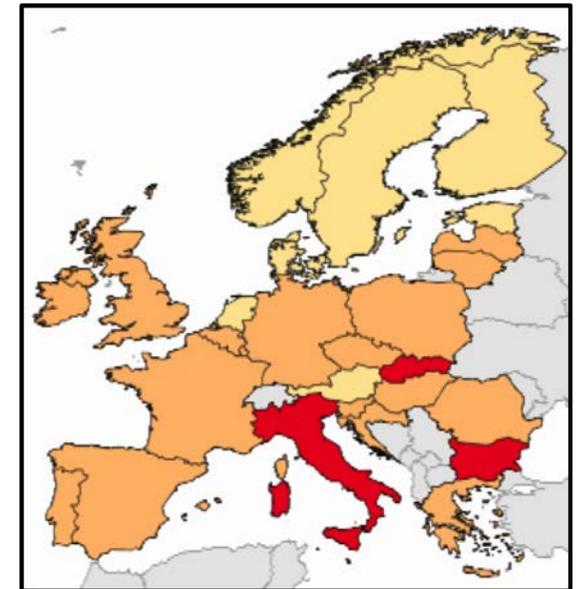


Résistance (R+I) aux fluoroquinolones

2003



2017



Source : *European Center for Disease Control*

## Un fardeau de + en + lourd

## + Peu de nouveaux antibiotiques

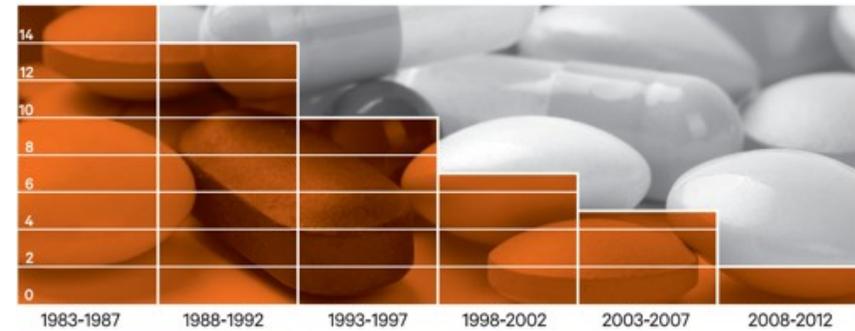
Estimated minimum number of illnesses and deaths caused by antibiotic resistance\*:

At least  **2,049,442** illnesses,  
 **23,000** deaths

*\*bacteria and fungus included in this report*

**Le nombre de nouveaux antibiotiques ne cesse de diminuer**

Nouveaux antibiotiques autorisés par la FDA, par période de 5 ans



# Les bactériophages...

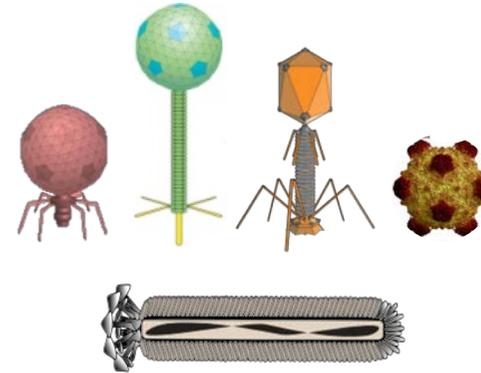
## ② Qu'est-ce que c'est ?



# Les bactériophages : qui sont-ils ?

Des virus qui infectent  
spécifiquement les bactéries

$10^{30}$  bactériophages sur la planète  
 $10^8$  génomes différents



De puissants régulateurs  
de la biomasse  
bactérienne



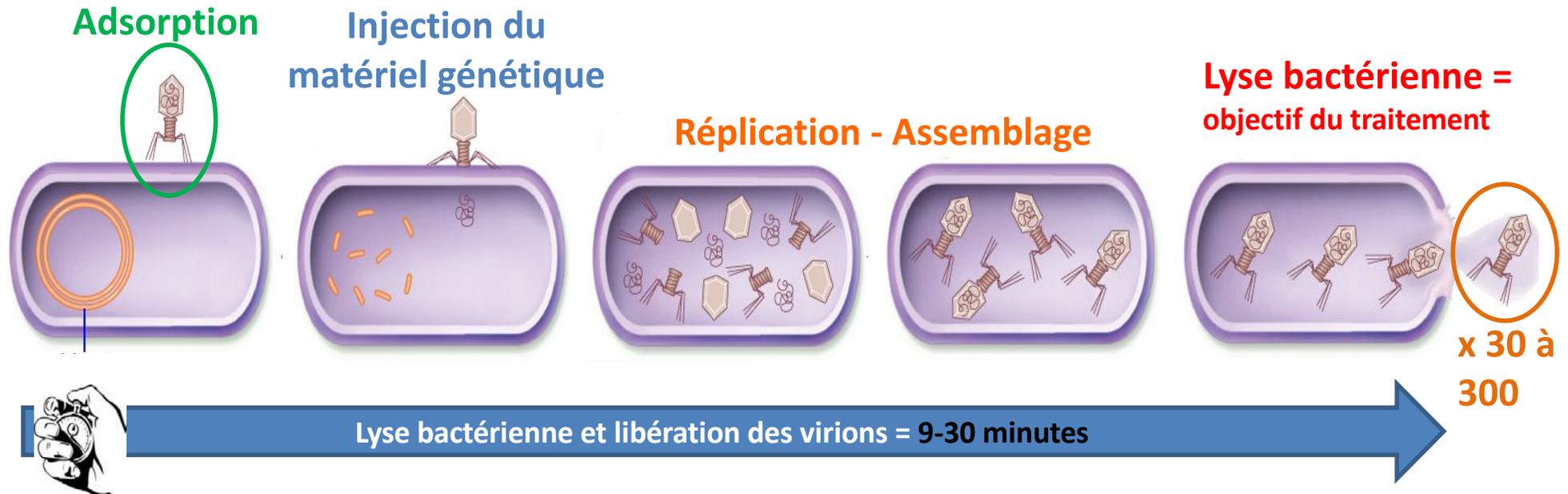
Des traitements anciens...  
inscrits dans le Vidal  
jusqu'en 1975...

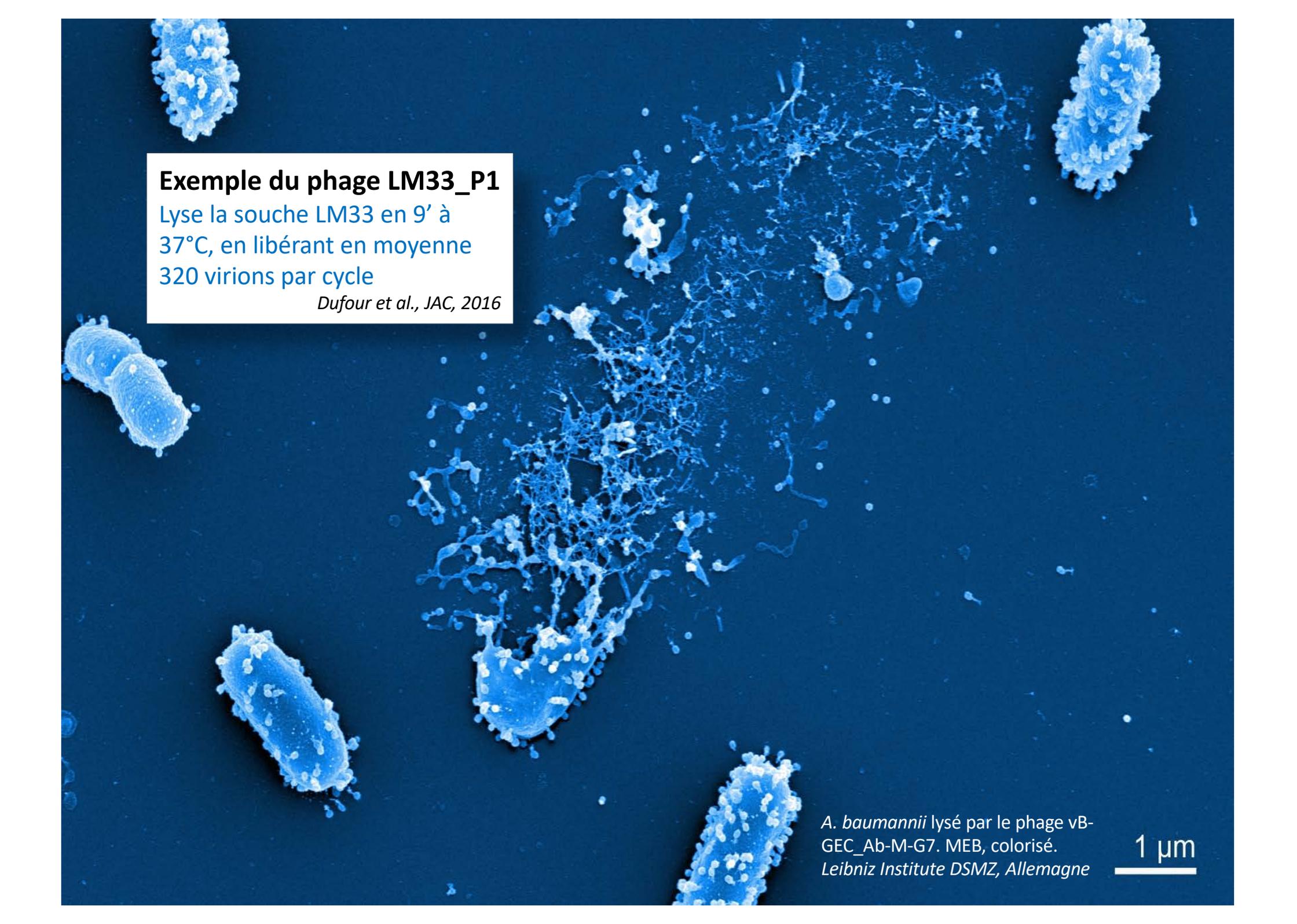




# Le cycle lytique

Les bactériophages =  
les seuls agents antibactériens dont la  
concentration augmente sur le site  
infectieux avec le temps





**Exemple du phage LM33\_P1**

Lyse la souche LM33 en 9' à  
37°C, en libérant en moyenne  
320 virions par cycle

*Dufour et al., JAC, 2016*

*A. baumannii* lysé par le phage vB-  
GEC\_Ab-M-G7. MEB, colorisé.  
*Leibniz Institute DSMZ, Allemagne*

1  $\mu$ m

# Éléments de comparaison

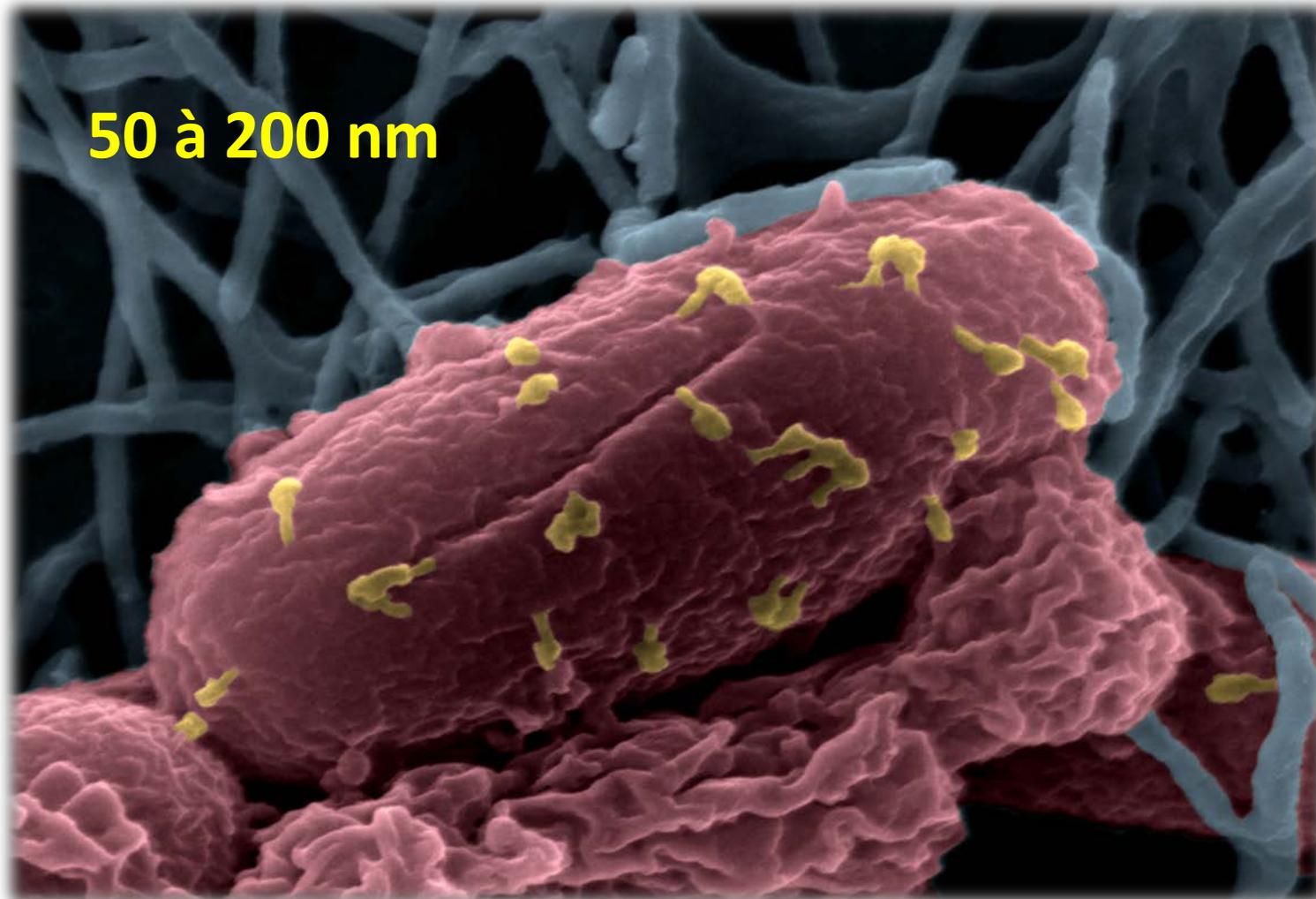
autres virus infectant les cellules eucaryotes

## *Temps pour lyser la cellule cible...*

- *Herpesviridae* (Smith JD, J Virol, 1973)
  - HSV : 8 heures
  - CMV : 4 jours
- *Influenza* (Gürtler L, Influenza Report, 2006)
  - 6 heures
- *Ebola* (Nanbo A, Scientific Reports, 2013)
  - 36 - 48 heures



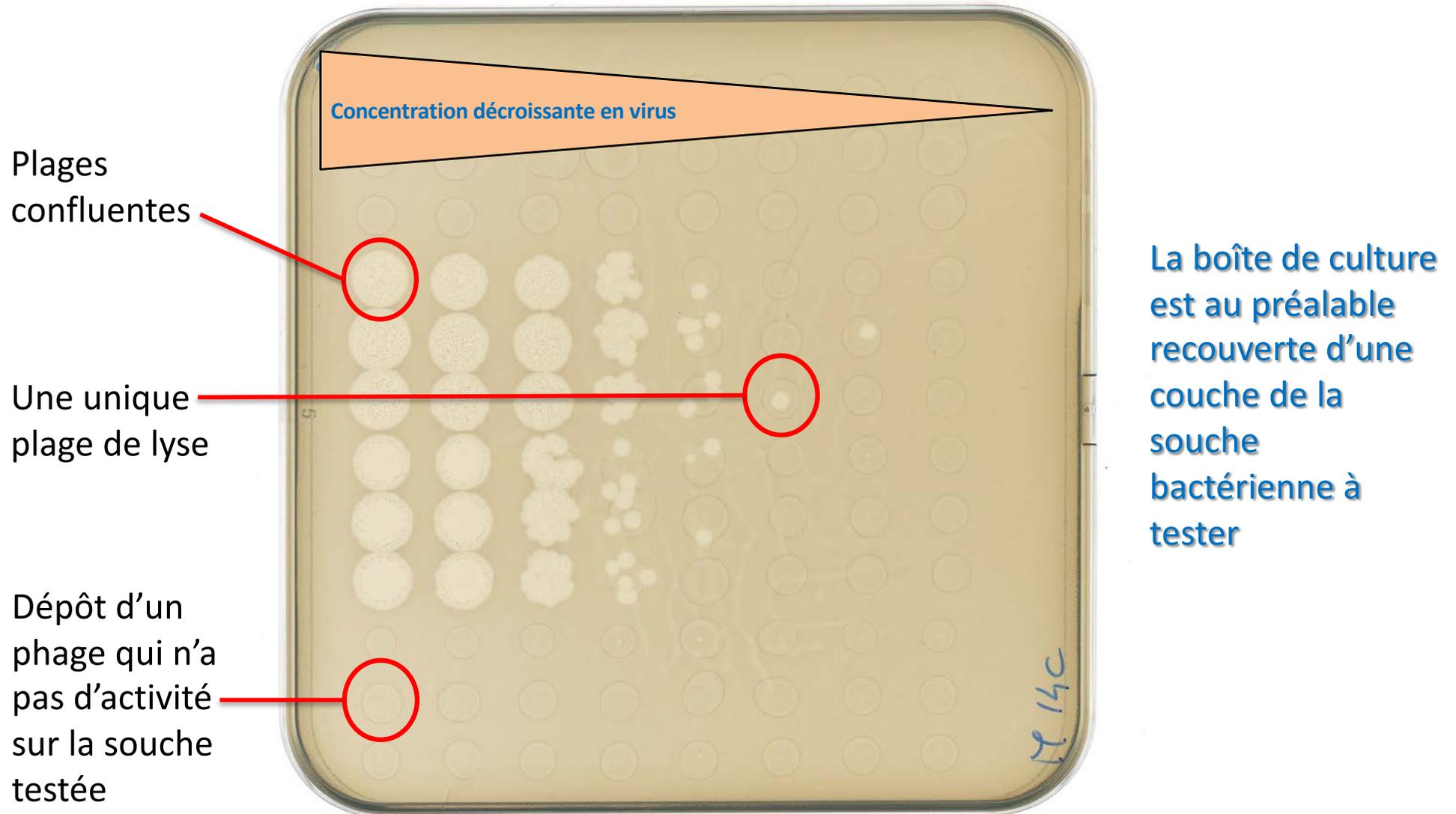
# Quelle taille ?



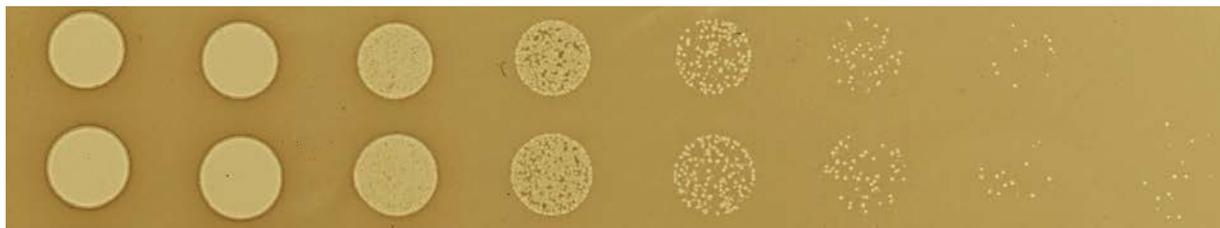
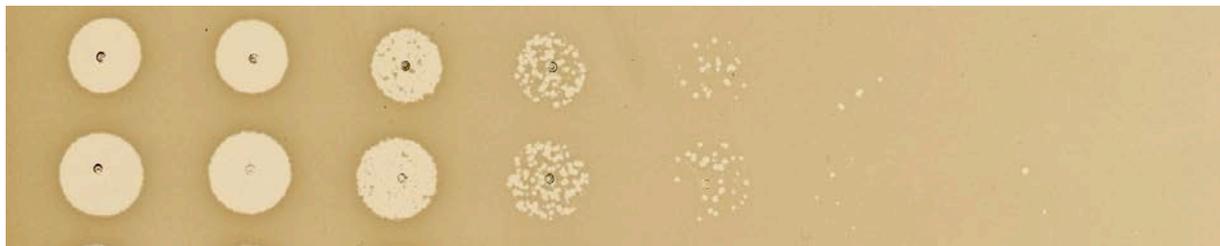
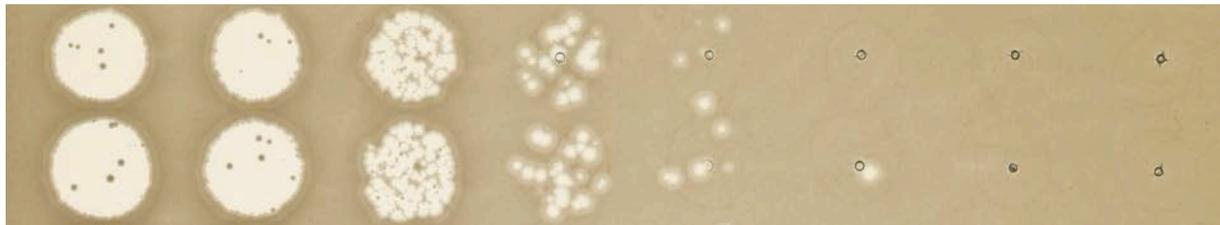
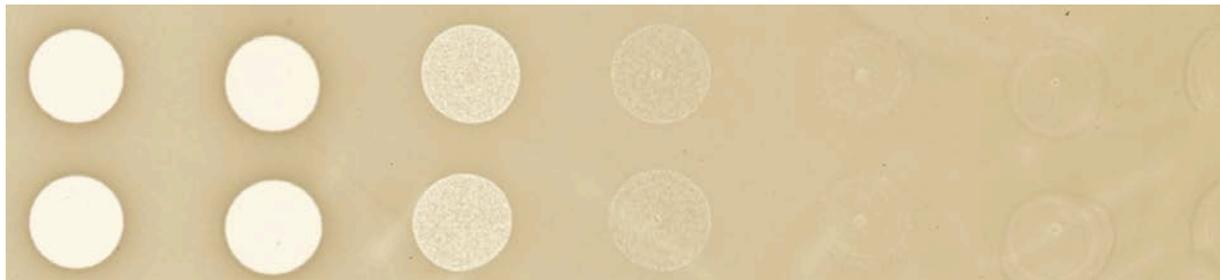
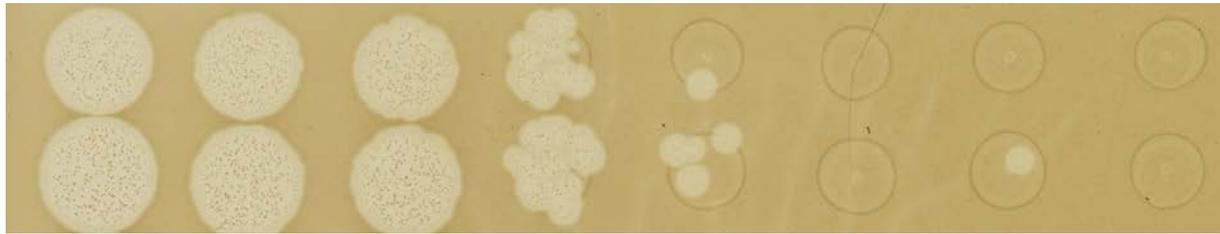
L. Debarbieux, *Institut Pasteur* (MEB, colorisé)

# “Plages de lyse”

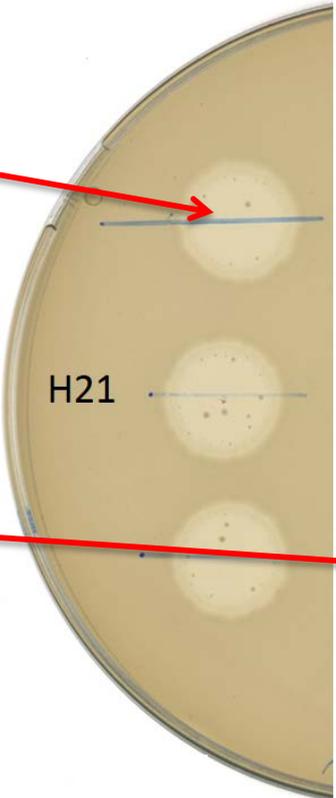
aspect sur boîte (milieu gélosé)



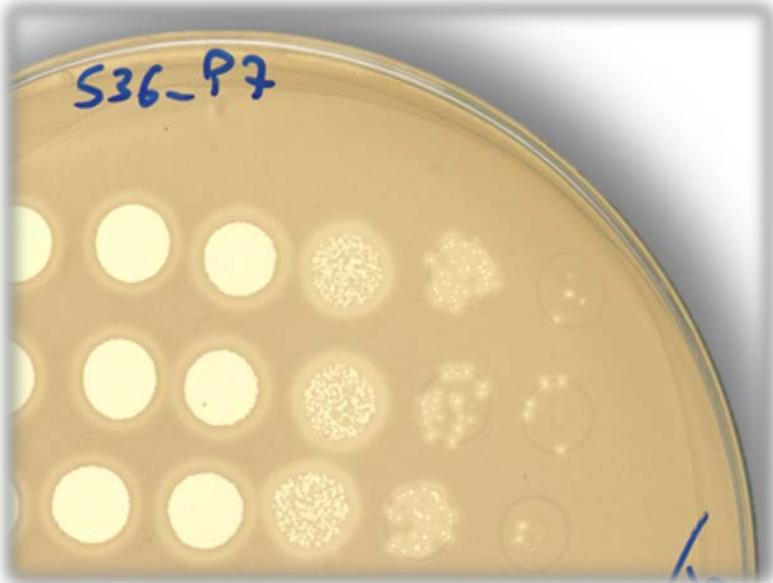
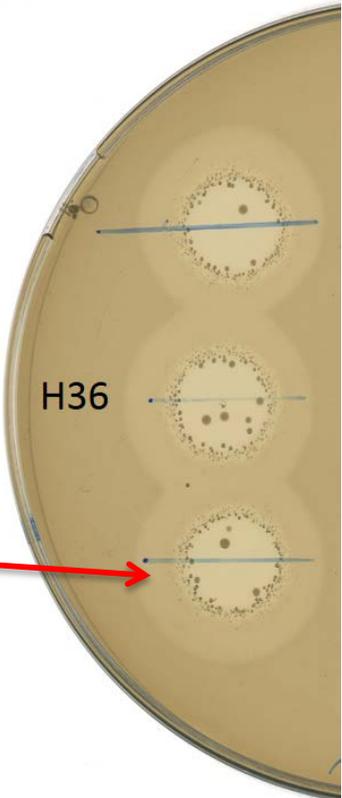
# Plages de lyse : différentes morphologies



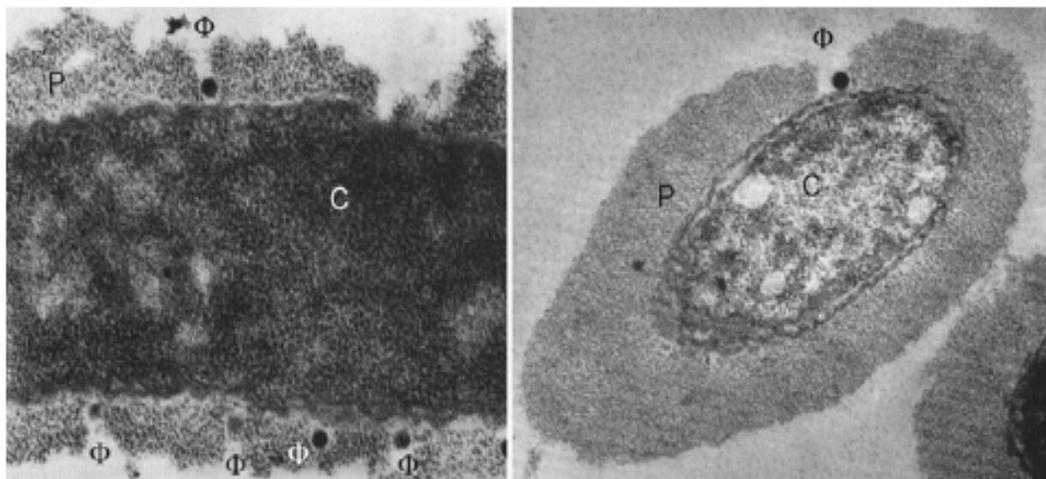
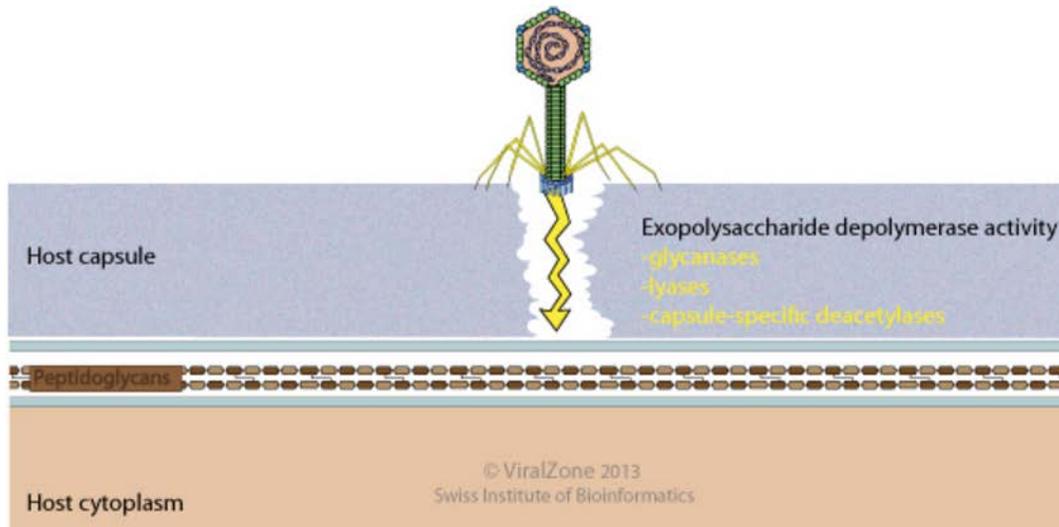
**Aire d'effacement complet du biofilm bactérien (lyse complète)**



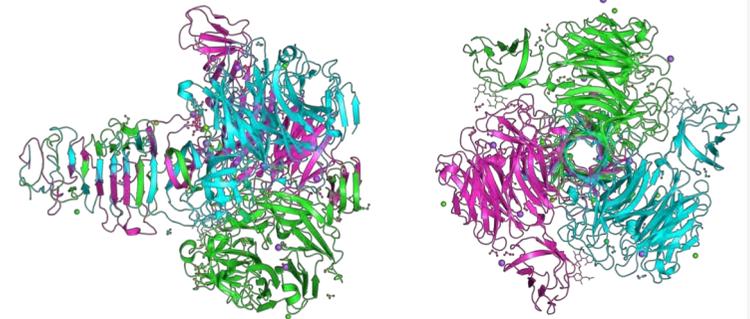
**Halo entourant la zone centrale de lyse : modifications du biofilm**



# Des fibres de queue qui possèdent une activité enzymatique...



Bayer et al., 1979



Extrémité de la fibre de queue du phage phi92 (activité endosialidase)

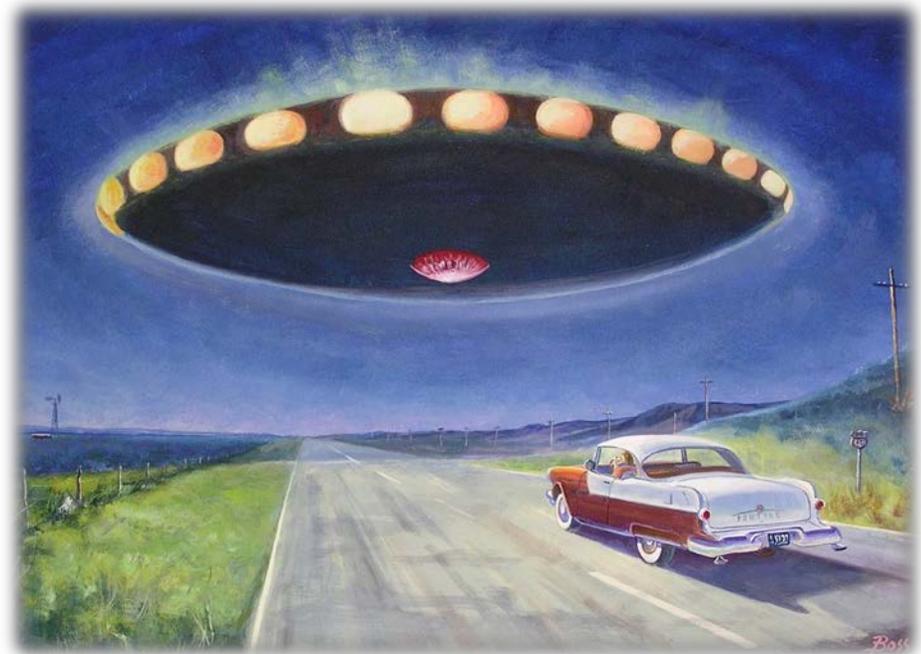
- Une action sur les germes capsulés
- Une activité hydrolytique contre le biofilm



- Infection ostéo-articulaire
- Matériel inextirpable
- ...

# Les bactériophages...

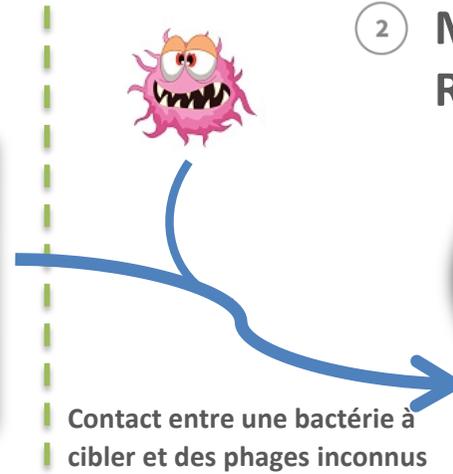
## ③ D'où viennent-ils?



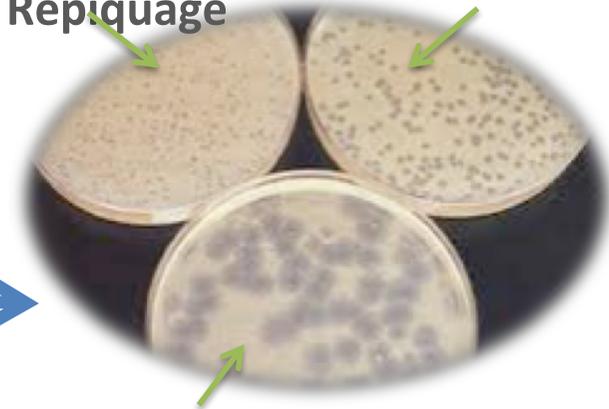
# D'où viennent-ils ?

... de l'environnement !

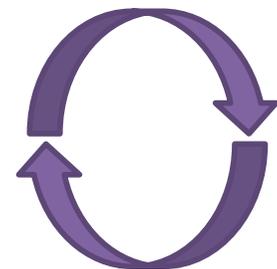
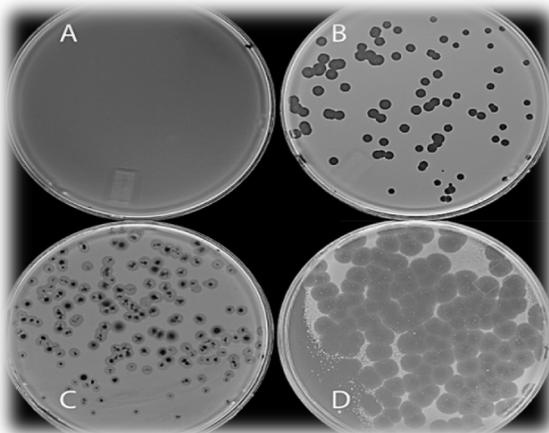
- ① Echantillon d'eau usée  
(source de virus)



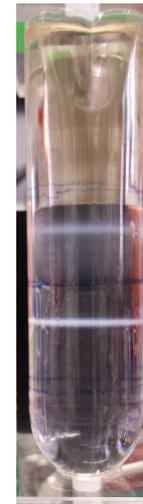
- ② Morphologies des plages de lyse  
Repiquage



- ③ Purification des phages



Amplification  
Concentration



Ultracentrifugations



Chromatographie

# Les bactériophages...

- ④ Leur utilisation aujourd'hui

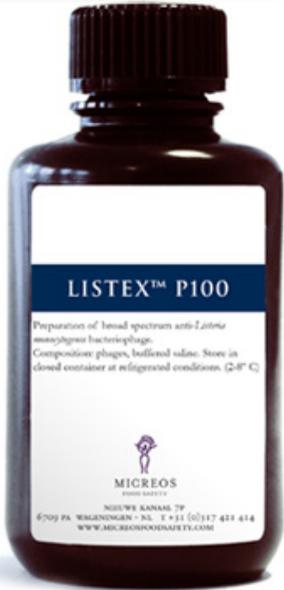


# Les bactériophages aujourd'hui

- Utilisation dans l'agro-alimentaire



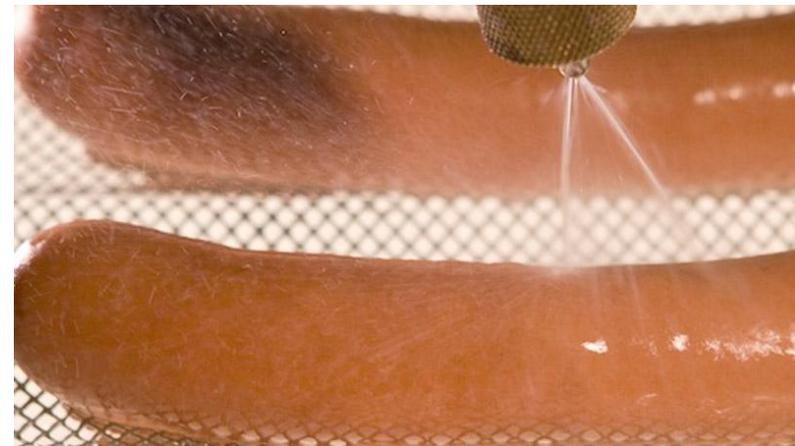
# Exemple d'une utilisation en agro-alimentaire



Solution de bactériophages anti-*Listeria monocytogenes*



Implémentation dans le processus de  
manufacture des aliments à risque



# Les bactériophages aujourd'hui

- Utilisation dans l'agro-alimentaire
- Utilisation en soins courants
  - Géorgie, Pologne, Russie essentiellement
  - En France... ATU / hors ATU (ANSM)
- Utilisation en recherche clinique



# Les bactériophages...

## ⑤ Leurs avantages et inconvénients

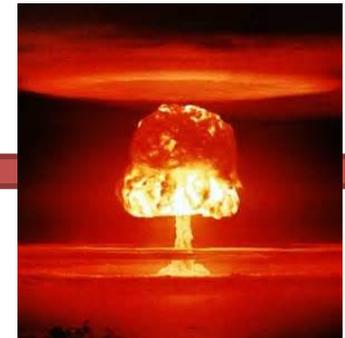
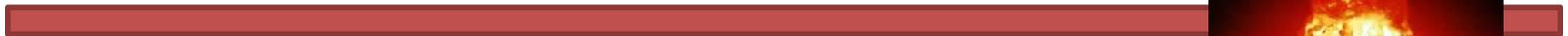


# Un spectre étroit



Impact réduit sur le microbiote digestif

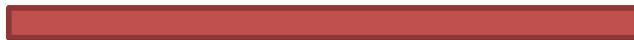
Imipénème



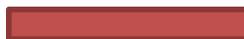
Cefotaxime



Amoxicilline  
clavulanate



Amoxicilline



Un phage



**Solution** : augmenter la diversité des attaquants (cocktail de bactériophages)



## L'association des bactériophages en cocktail : une sommation des spectres d'hôtes individuels

Bactéries (n=196)

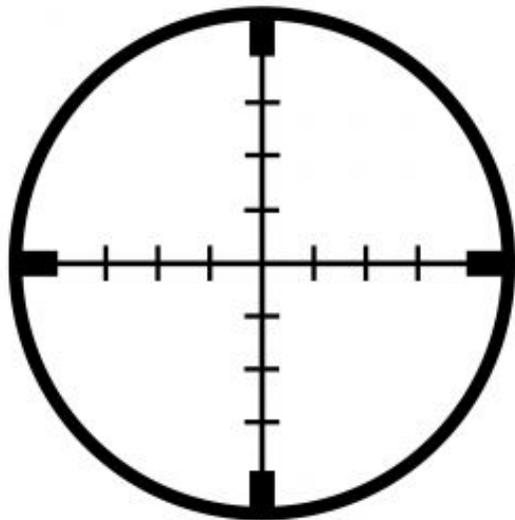
Exemple

71 bactériophages testés contre 196 souches d'*E. coli* responsables de pneumonies acquises sous ventilation mécanique

Bactériophages (n=71)

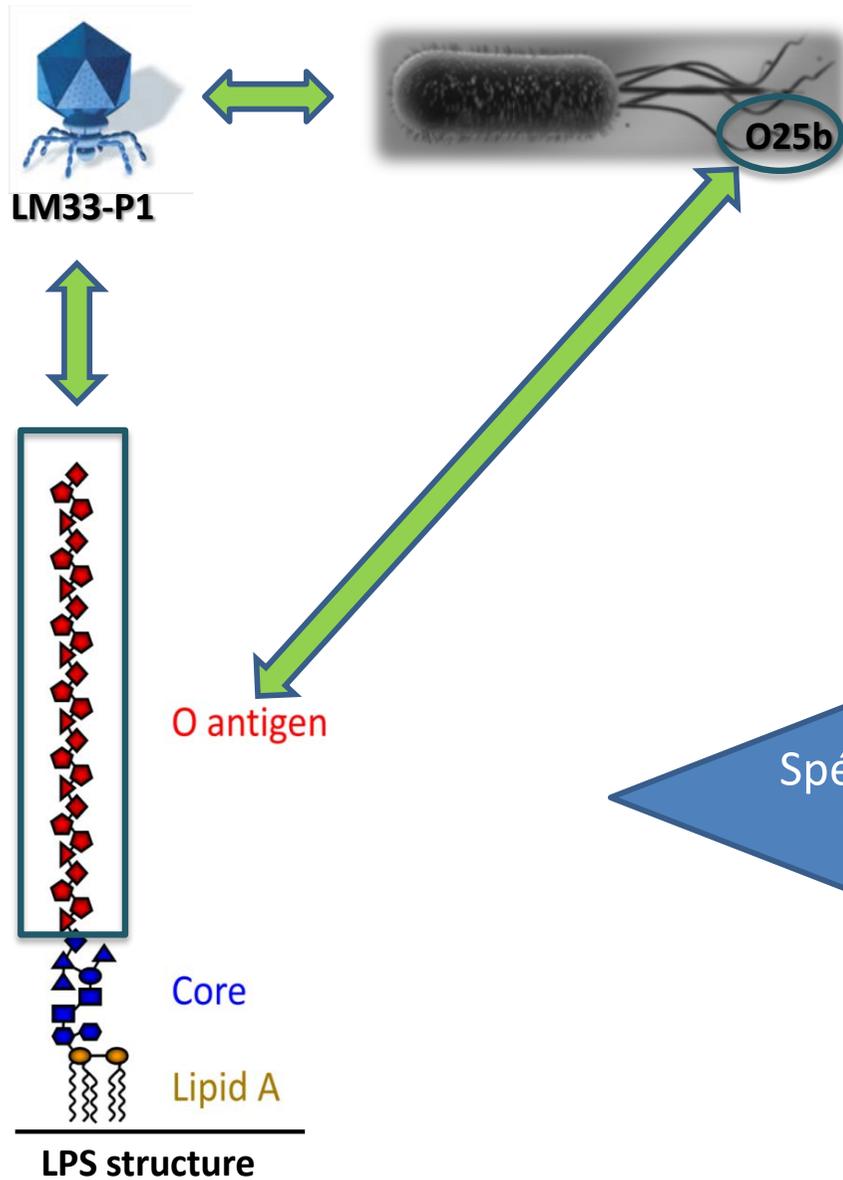
Bactériophage	Nombre de souches		Couverture cumulée	
	lysées par bactériophage	absolue (n)	relative (%)	
1 536-P3	78	79	40,3	
2 LF73-P1	69	109	55,6	
3 DIJ07-P1	67	118	60,2	
4 LF110-P3	64	137	69,9	
5 55989-P2	47	142	72,4	
6 LM40-P1	17	145	73,9	
7 LM33-P1	9	148	75,5	

- Spectre étroit = permet un “ciblage” spécifique



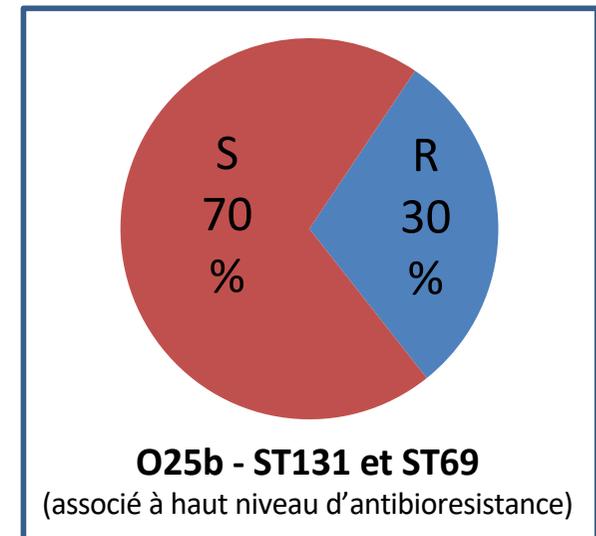
Exemple du phage LM33-P1 et des souches O25b-ST131 chez *E. coli*

# LM33-P1 : un bactériophage qui infecte spécifiquement ce complexe clonal !



LM33-P1 testé contre 283 souches de sérotype connu (isolats cliniques, collections variées)

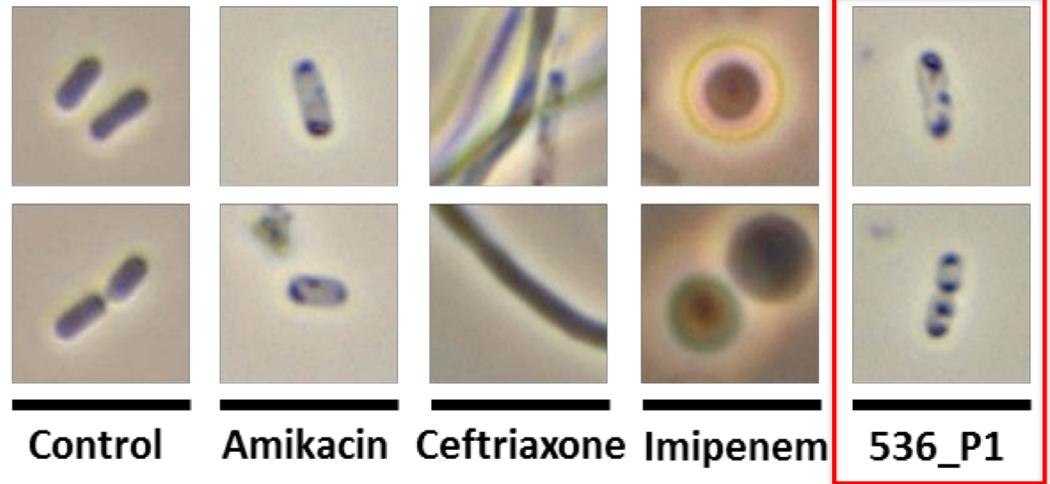
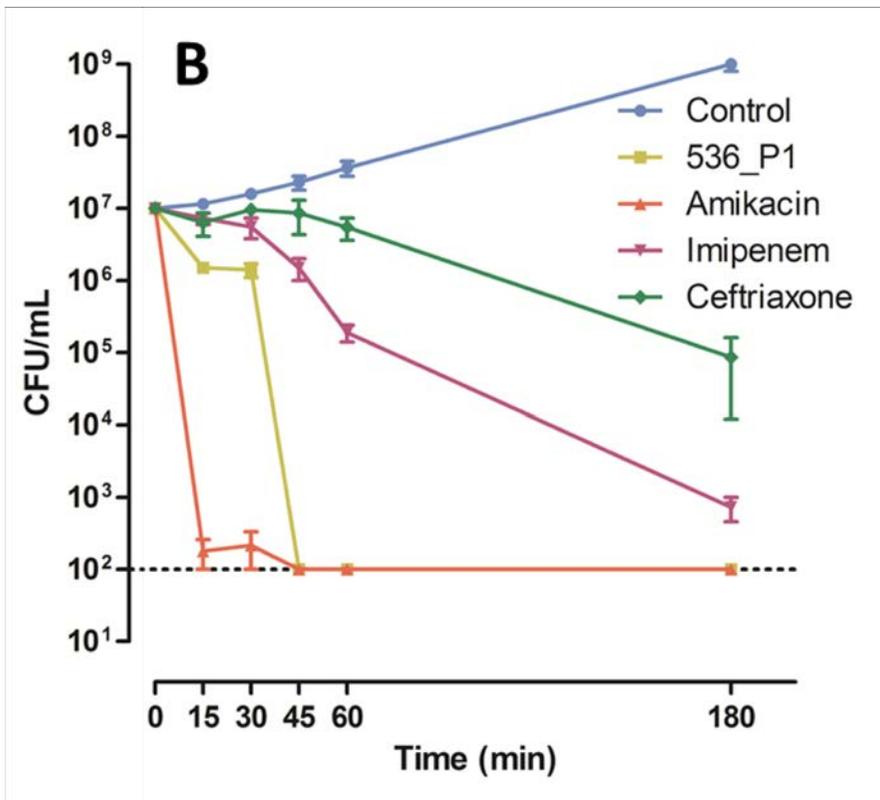
Spécificité :  
100%



# Une cinétique rapide

un mode d'action se rapprochant de celui des aminosides

**In vitro**  
1 souche d'*E. coli*  
+ 1 phage / antibio.  
A H3 de cultures à 37°C  
C° antibio. = 8x la CMI



# Les bactériophages...

## ⑥ Leur innocuité ?



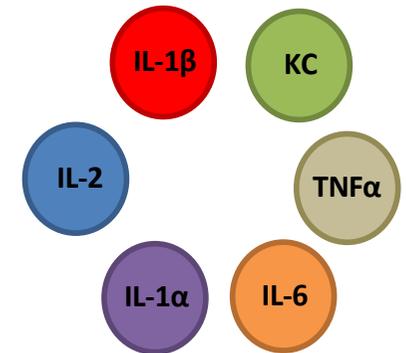
# Les bactériophages : des molécules pro-inflammatoires ?



Mise en jeu de **l'immunité innée** avec synthèse de molécules pro-inflammatoires ?

- *In vitro* : non
- *In vivo* chez l'animal : non
- *In vivo* chez l'homme : non

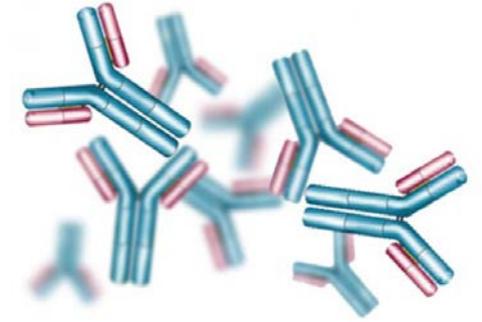
Sous réserve d'une préparation correctement purifiée



- Miedzybrodzki R, **Clinical aspects of phage therapy**, *Adv Virus Res*, 2012
- Bruttin A, **Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy**, *Antimicrob Agents Chemother*, 2005
- McCallin S, **Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects**, *Virology*, 2013
- Miernikiewicz P, **T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production**, *PLoS One*, 2013.
- Dufour N, **Commentary: Morphologically Distinct Escherichia coli Bacteriophages Differ in Their Efficacy and Ability to Stimulate Cytokine Release In Vitro**, *Front Microbiol*, 2016
- Dufour N, **Phage therapy treatment of murine pneumonia is not associated with an over inflammatory stimulation**, en cours de publication



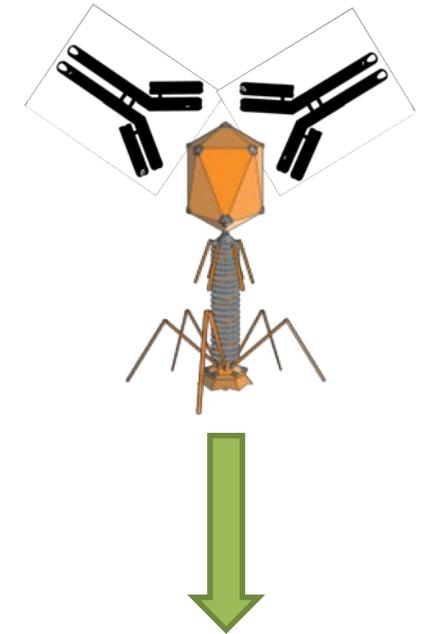
Mise en jeu de **l'immunité adaptative** avec  
synthèse d'anticorps anti-bactériophages : **OUI !**



L'administration de bacteriophages **peut potentiellement  
générer l'apparition d'Ac** anti-bactériophages

Une **limitation dans le cas des applications chroniques**

Une **potentielle réactivité croisée** entre phages ?



**Perte ou diminution de  
l'activité anti-bactérienne**

**Neutralisation du  
bactériophage**

- Dabrowska K, Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol*, 2014
- Shiley JR, Immunogenicity and antimicrobial effectiveness of *Pseudomonas aeruginosa* specific bacteriophage in a human lung in vitro model, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017
- Krut O, Contribution of the Immune Response to Phage Therapy, *J Immunol*, 2018



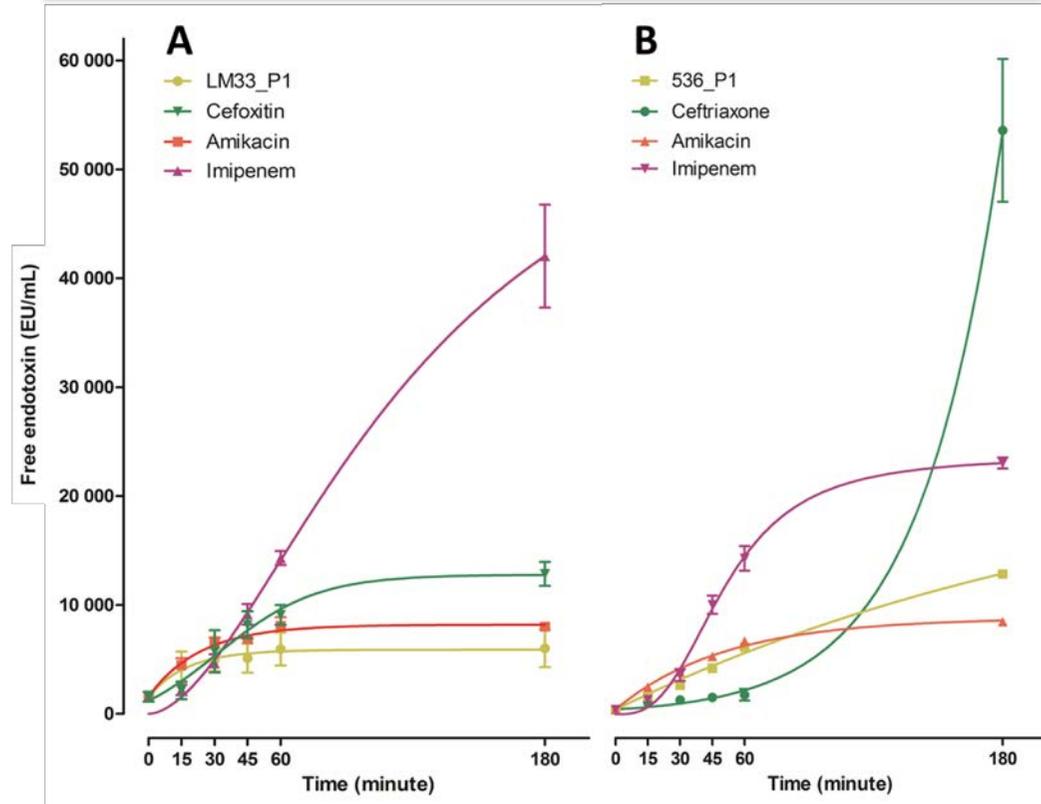
# Relargage d'endotoxine

## The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by $\beta$ -Lactams

Nicolas Dufour,<sup>1,2,3</sup> Raphaëlle Delattre,<sup>1,3,4</sup> Jean-Damien Ricard,<sup>2,3,5</sup> and Laurent Debarbieux<sup>1</sup>

- **La crainte** : compte tenu de la rapidité avec laquelle les phages peuvent lyser les bactéries, ils pourraient générer une importante libération d'endotoxine avec des conséquences délétères

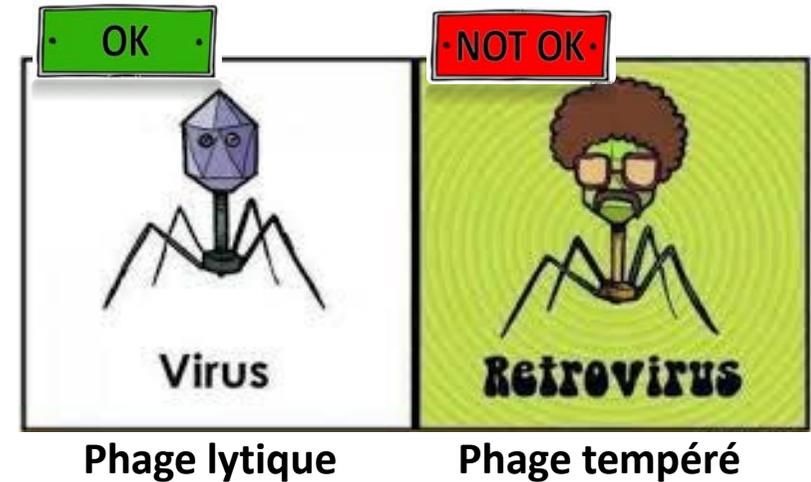
### *In vitro* – Deux souches avec deux phages



? Si j'ai peur  
des virus

# Phages lytiques ≠ phages tempérés

- Les phages tempérés sont capables de véhiculer des gènes codant pour des toxines ou des mécanismes de résistances aux antibiotiques



Des exemples que vous connaissez... !

***S. aureus***

Pneumonies nécrosantes

- Leucocidine de Panton-Valentine
- Gènes phiSLT et phiPVL portés par un prophage...

***V. cholerae***

Choléra

- Toxine cholérique
- Gènes CtxA et CtxB portés par le prophage CTX-Phi...

***E. coli*** (O104:H4, O157:H7, ...)

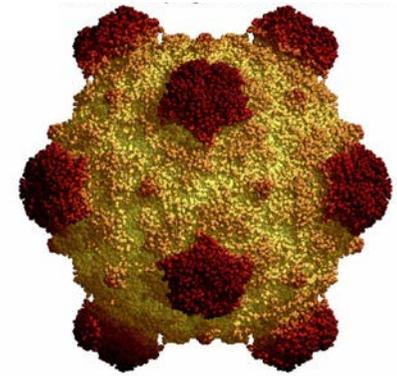
SHU, colites hémorragiques

- Shigatoxine
- Gène Stx1 et Stx2 portés par un prophage...

→ Utilisation de phages lytiques, exclusivement !



# Injection de phages en IV ?



Bacteriophage PhiX174

Oui !!

Et ce n'est pas nouveau !

Clin Immunol Immunopathol. 1989 May;51(2):252-63.

**Human antibody responses to bacteriophage phi X 174: sequential induction of IgM and IgG subclass antibody.**

Pyun KH<sup>1</sup>, Ochs HD, Wedgwood RJ, Yang XQ, Heller SR, Reimer CB.

Blood. 1992 Sep 1;80(5):1163-71.

**Antibody responses to bacteriophage phi X174 in patients with adenosine deaminase deficiency.**

Ochs HD<sup>1</sup>, Buckley RH, Kobayashi RH, Kobayashi AL, Sorensen RU, Douglas SD, Hamilton BL, Hershfield MS.

J Infect Dis. 2000 Aug;182(2):435-41. Epub 2000 Jul 21.

**Evaluation of CD4+ T cell function In vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization.**

Fogelman I<sup>1</sup>, Davey V, Ochs HD, Elashoff M, Feinberg MB, Mican J, Siegel JP, Sneller M, Lane HC.

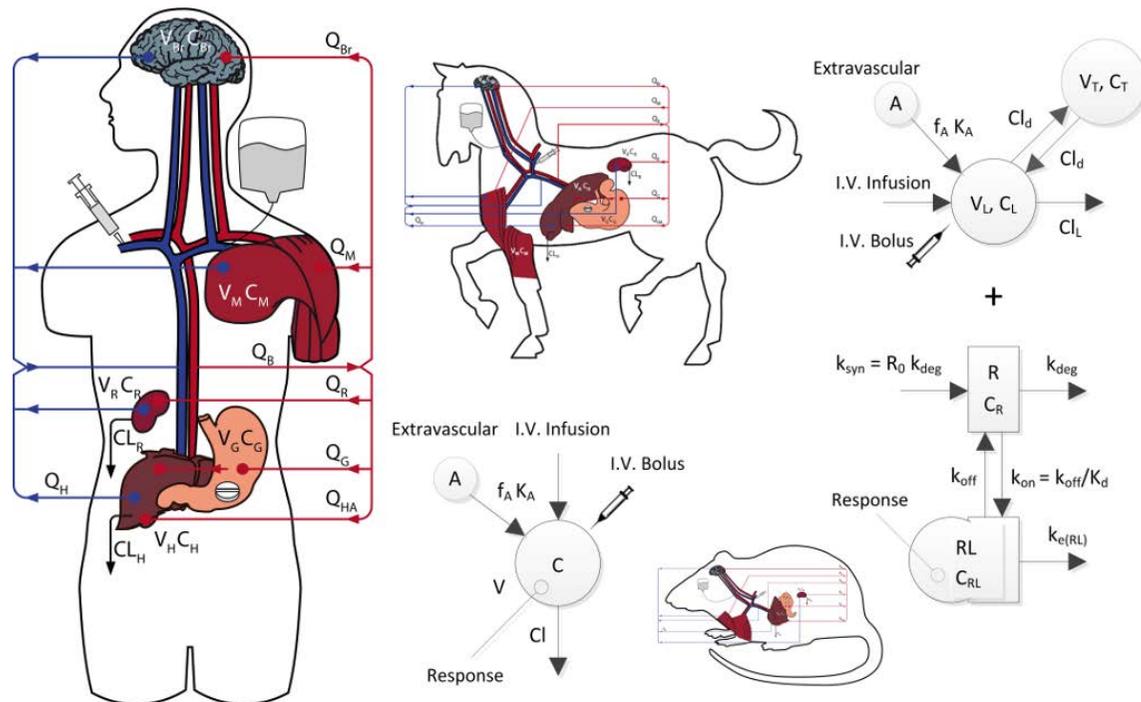
AIDS. 2000 Mar 10;14(4):F55-62.

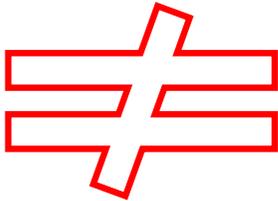
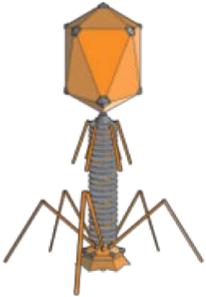
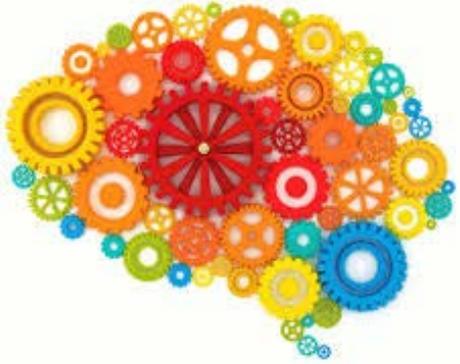
**Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage phi X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients.**

Rubinstein A<sup>1</sup>, Mizrahi Y, Bernstein L, Shliozberg J, Golodner M, Liu GQ, Ochs HD.

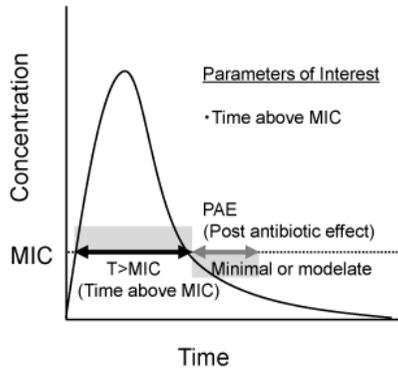
# Bacteriophages...

## 7 Leurs propriétés pharmacologiques (PK / PD)

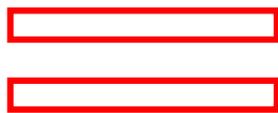
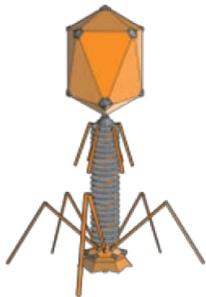
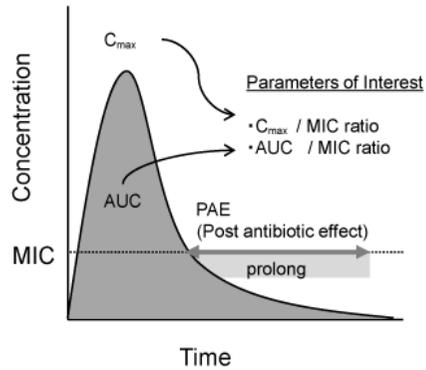




Time-dependent antibiotics



Concentration-dependent antibiotics



Des agents antibactériens dont la concentration augmente sur le site infectieux au cours du temps

# Les bactériophages...

## 8 Et les infections pulmonaires



# Phagothérapie dans différents modèles de pneumonie chez l'animal

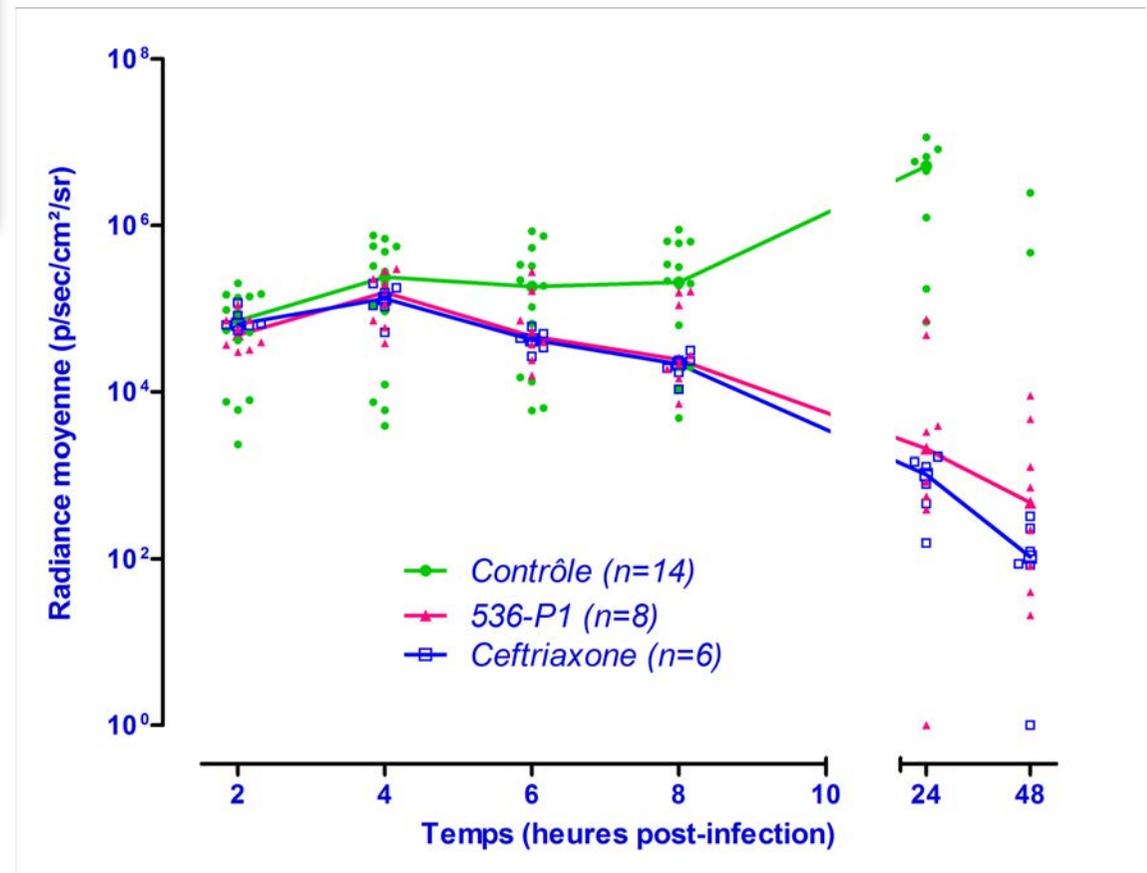
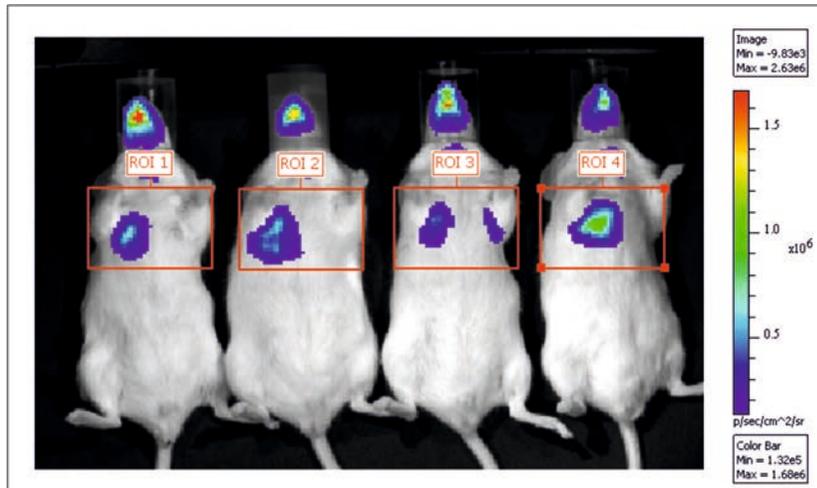
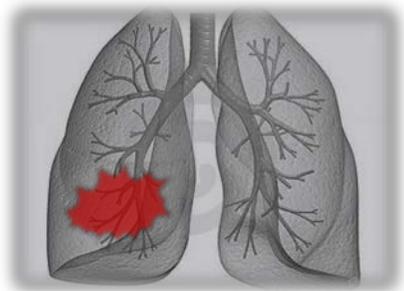
Bactérie	Animal	Infection / Traitement	Principaux résultats (effet du traitement par bactériophages)	Référence	Bactérie	Animal	Infection / Traitement	Principaux résultats (effet du traitement par bactériophages)	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence)	Alemayehu, 2012	<i>Staphylococcus aureus</i>	Souris	IN/ IP	Souris neutropénique. Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de la survie, moindre inflammation	Takemura-Uchiyama, 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation	Debarbieux, 2010	<i>Escherichia coli (APEC)</i>	Poulet	IT / IT, eau, IO	Pas d'effet sur la mortalité, pas d'effet sur les lésions histologiques macroscopiques	Tsonos, 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de survie. Efficacité curative et préventive.	Morello, 2011	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Souris	IT / IN ou IP	Réduction de la charge bactérienne (compte), moindre inflammation	Carmody, 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Etude de la corrélation entre activité in vitro/in vivo. Réduction de la charge bactérienne, augmentation de la survie	Henry, 2013	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Souris	Aér. / Aér. ou IP	Souris neutropéniques. Réduction de la charge bactérienne. Effet nul par voie IP	Semler, 2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IN / IP	Réduction de la charge bactérienne. Diminution de l'inflammation. Effet d'une formulation liposomale sur l'approche préventive	Singla, 2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IN / IP	Réduction de la charge bactérienne (compte)	Chhibber, 2008
<i>Escherichia coli</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation	Dufour, 2015	<i>Escherichia coli (APEC)</i>	Poulet	IPulm / IM	Réduction de la mortalité, réduction de lésions macroscopiques	Huff, 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vison	IN / Aér. ou IN	Réduction de charge bactérienne (compte), augmentation de la survie, absence de toxicité par doses répétées	Cao, 2015	<i>Escherichia coli (APEC)</i>	Poulet	Infection spontanée / eau et Aér.	Réduction de mortalité dans un essai grandeur nature en élevage (batterie de 5000-10000 poulets)	Oliveria, 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne, diminution de l'inflammation	Pabary, 2015	<i>Escherichia coli (APEC)</i>	Poulet	IT / IT	Réduction de mortalité, réduction de la charge bactérienne, réduction de morbidité (perte de poids)	Lau, 2010



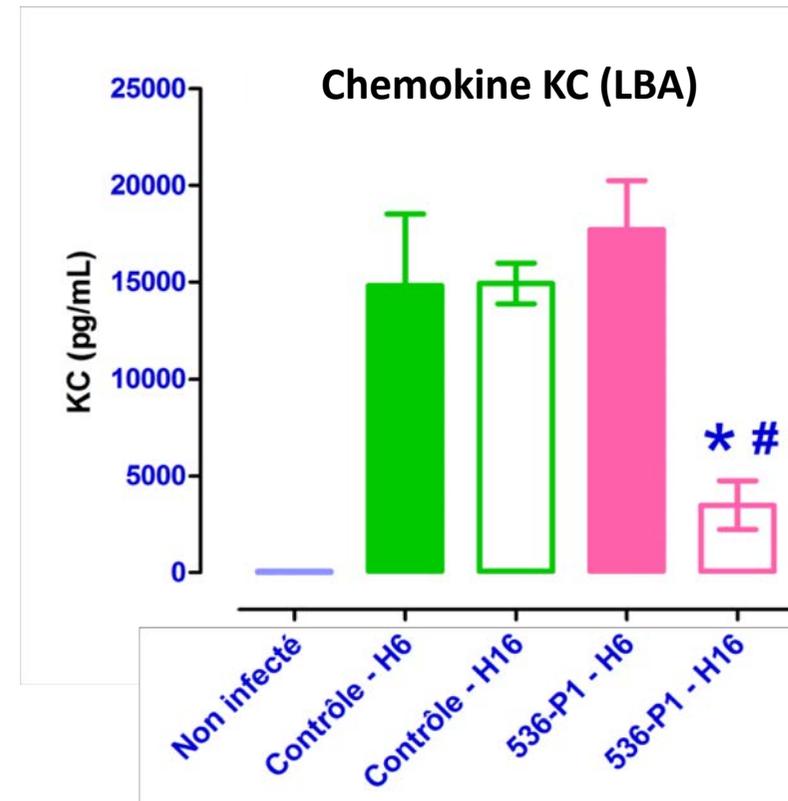
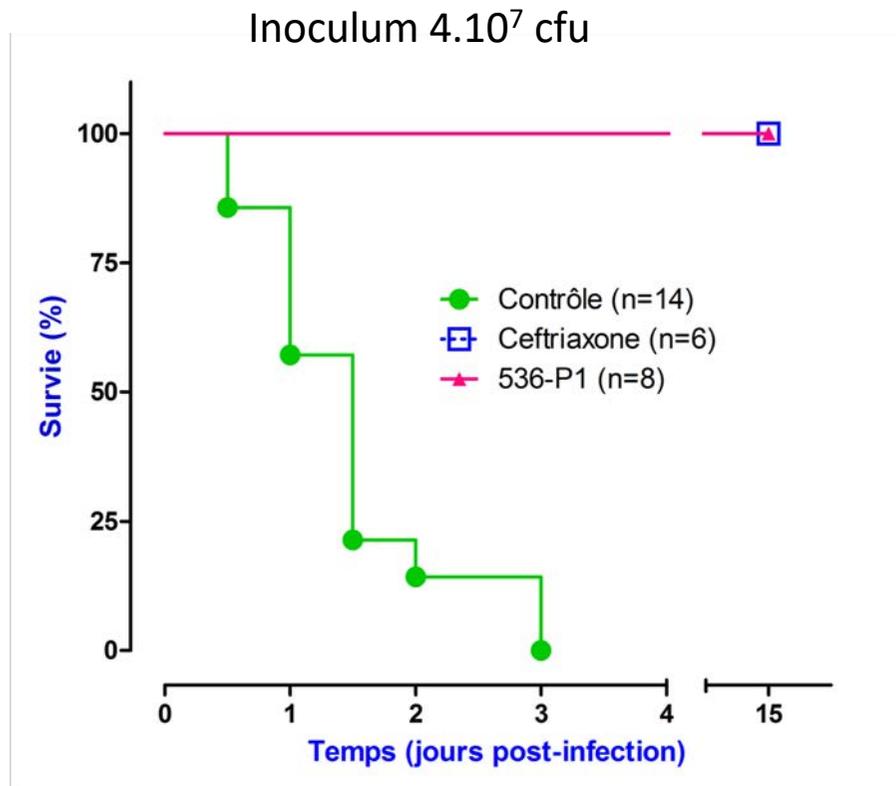
- ❶ Réduction de la charge bactérienne
- ❷ Réduction de la mortalité
- ❸ Réduction de l'inflammation

# Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages

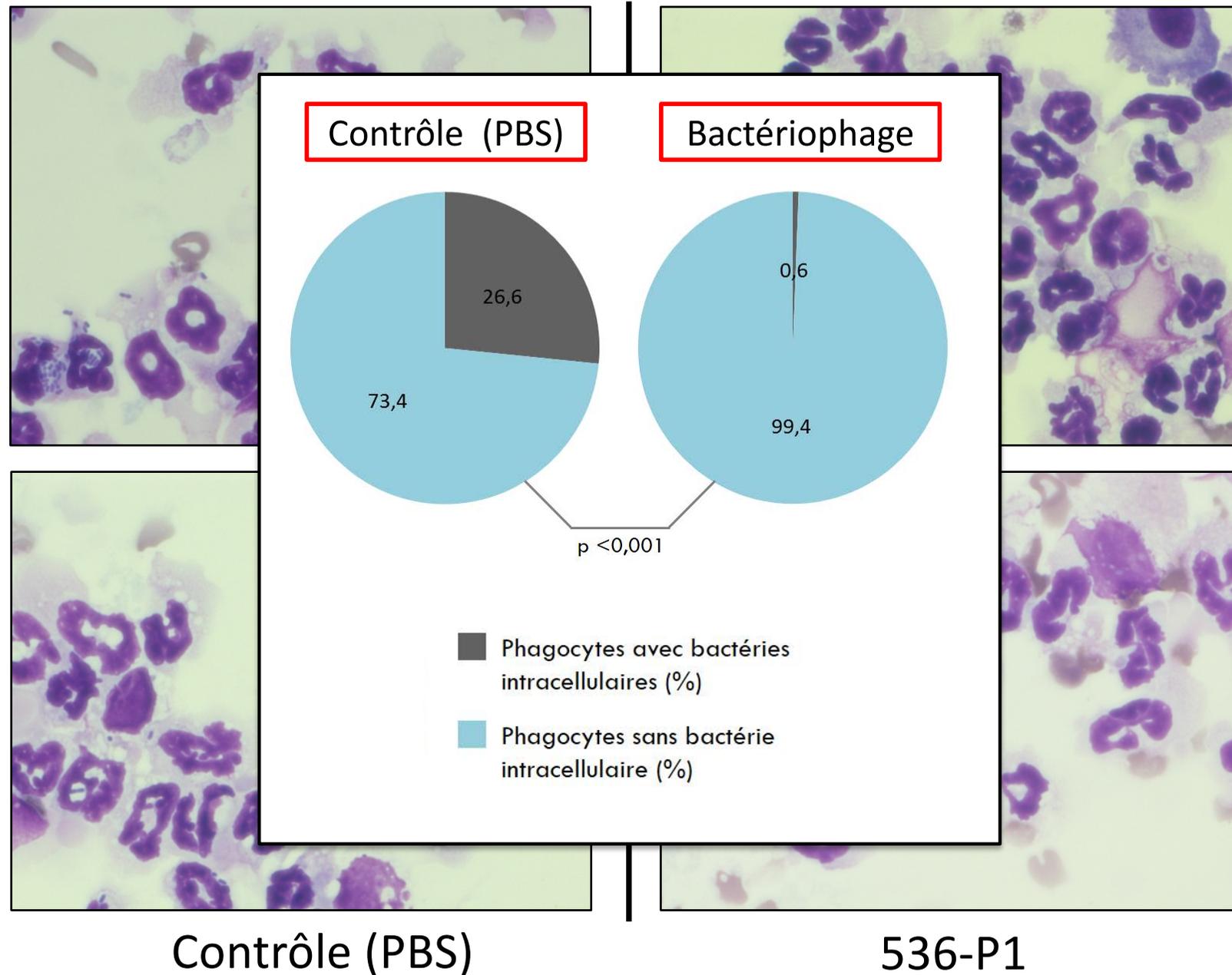
Dufour et al., Crit Care Med, 2015



# Un traitement curatif Une réduction de l'inflammation



# LBA – H16 post-infection – Observations cytologiques



# Les bactériophages...

## 9 Perspectives



# Une diversité incommensurable dans laquelle puiser



- Diversité de spectre
- Diversité de cinétique
- Diversité d'équipement enzymatique
- Plasticité : un grand potentiel d'adaptation

Une diversité supérieure à celle des antibiotiques



Développer de larges collections de  
bactériophages bien caractérisés :  
**phagothèques thérapeutiques**



# Perspectives

- **“CNR” de la Phagothérapie (bien public ?)**
  1. Elaboration de cocktails d'urgence par pathologie
  2. Disposer d'une phagothèque bien caractérisée
  3. Isolement de phages pour des thérapies individualisées
  4. Eviter les erreurs commises avec les antibiotiques
- **Poursuite des essais cliniques**
- **Législation à adapter à cette nouvelle thérapeutique**
- **Impact écologique à long terme inconnu : à évaluer**



# Tom's story

**Tom Patterson**, psychiatre (faculté de médecine de San Diego), 69 ans, fin 2015.

- Pancréatite aiguë lors d'un voyage en Egypte
  - Rapatriement sur San Diego
  - Couées de nécrose, infections multiples, réanimation lourde
  - Septicémie - infection intra-abdominale à *A. baumannii* multi-R
  - Echecs de multiples antibiothérapies
  - Traitement par Phages en administration locale **et IV**
- > **Guérison**



EXPERIMENTAL THERAPEUTICS

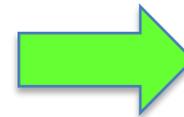
Oct. 2017 - Schooley, R. T.



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY

Antimicrobial Agents  
and Chemotherapy®

Development and Use of Personalized  
Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails  
To Treat a Patient with a Disseminated  
Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection



Décembre 2015



Mai 2018



# Merci de votre attention !

