

Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales

La phagothérapie constitue-t-elle un traitement potentiel des infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose.

Auteur : Riffie Anass
Promoteur(s) : Thomas Michiels
Année académique 2021-2022
Master en sciences pharmaceutiques, finalité spécialisée

Remerciements

Je voudrai avant tout remercier tous les professeurs et l'équipe académique qui m'ont offert un enseignement de qualité durant mes 5 années passées à l'université. Les remercier pour leur implication et leur volonté de nous transmettre leur savoir, afin de faire de nous des professionnels de santé aguerris.

Je tiens à montrer toute ma gratitude à mon promoteur, le professeur Thomas Michiels, pour m'avoir transmis, via ces cours, sa passion de la microbiologie qui m'a guidé lors du choix de mon sujet de mémoire. J'aimerais le remercier pour sa disponibilité, pour tous ses conseils très pertinents, ainsi que pour tout le temps qu'il a consacré à la relecture de mes travaux.

Je remercie également les membres du jury d'avoir pris la peine d'accepter de juger mon travail.

Je tiens à dédier ce travail, plus particulièrement, à mes parents qui m'ont soutenu durant ces longues années d'études, et m'ont donné la force et le courage nécessaire pour arriver au bout.

Je dédie également ce travail à tous mes proches, mes amis, ma famille pour leur soutien inconditionnel. Plus particulièrement à mes amis et camarades de fac avec qui nous avons gravi les échelons ensemble et qui ont été une grande source de motivation.

« Je déclare sur l'honneur que ce mémoire a été écrit de ma plume, sans avoir sollicité d'aide extérieure illicite, qu'il n'est pas la reprise d'un travail présenté dans une autre institution pour évaluation, et qu'il n'a jamais été publié, en tout ou en partie. Toute les informations (idées, phrases, graphes, cartes, tableaux...) empruntées ou faisant référence à des sources primaires ou secondaires sont référencées adéquatement selon la méthode universitaire en vigueur. Je déclare avoir pris connaissance et adhérer au Code de déontologie pour les étudiants en matière d'emprunts, de citations et d'exploitation de sources diverses et savoir que le plagiat constitue une faute grave. »

Abréviations

CRP	C-Reactive Protein
PsA	Pseudomonas aeruginosa
MDR	Multidrug-resistant
MOI	Multiplication of infection
WT	Wilde type
ATB	Antibiotiques
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
CFU	colony-forming unit
AMK	Amikacine
MPM	Méropénème
TOB	Tobramycine
CF	Cystic fibrosis
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ILC	Cellule lymphoïde innée

Listes des figures

Figure 1 : Taux d'incidence annuelle mondiale de la mucoviscidose

Figure 2 : Etapes du développement des biofilms

Figure 3 : Aperçu des principales différences entre le cycle du bactériophage lytique et celui du bactériophage lysogène

Figure 4 : Saturation en oxygène et utilisation d'antibactériens au cours de l'évolution clinique de notre patient

Figure 5 A : Efficacité antibactérienne d'une instillation intratrachéale des phages HX1 et MY9 contre les infections à pseudomonas dans les modèles de pneumonie aiguë de souris

Figure 5 B : Titre phagique dans les poumons infectés chez la souris après un traitement par instillation intratrachéale

Figure 6 : Courbe de la charge bactérienne (CFU) dans les poumons infectés en fonction du temps dans le groupe contrôle et le groupe traité par le phage MYY9

Figure 7 : Dynamique de la concentration de biomarqueurs inflammatoires sélectionnés (TNF- α et IL-6) dans le BALF (Bronchoalveolar Lavage Fluid) au fil du temps mesuré par Elisa

Figure 8 : Efficacité, *in vitro*, des différents phages et du cocktail de phages sur différentes souches de Pseudomonas

Figure 9 A : Infections respiratoires mortelles après que 1×10^{-7} CFU de la souche PAK- lumi (produisant la luciférase) de pseudomonas aeruginosa ($n=5$ souris pour chaque groupe de traitement et $n=3$ pour les souris non traitées) ont été instillées par voie intranasale

Figure 9 B : Emission de photons de la zone thoracique des souris infectées quantifiée à l'aide d'un système d'imagerie IVIS Spectrum 100

Figure 10 : Croissance du biofilm (A) et activité métabolique (B) de PsA ATCC 27853 sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages. Les comparaisons ont été effectuées entre les groupes, à plusieurs intervalles de temps.

Figure 11 : Croissance du biofilm (A) et activité métabolique (B) de PsA ATCC 2110 de 24 à 168 h de croissance dynamique du biofilm sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages

Figure 12 : Croissance du biofilm (A) et activité métabolique (B) de PsA ATCC 2112 de 24 à 168 h de croissance dynamique du biofilm sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages

Figure 13 : (A) Biofilms à quarante-huit heures de PAO1 *gfp* et de PAK *gfp* sans et après addition du cocktail de phages cocktail de 6 phages (+CK) (B) Des biofilms de vingt-quatre heures des souches de *PsA* indiquées ont été exposés pendant 4 heures au cocktail de phages

Figure 14 A : Imagerie *in vivo* représentative après traitement de souris vivantes infectées par *PsA*

Figure 14 B : Le traitement monophage inhalé à dose unique (MOI de 10) d'une infection respiratoire aiguë mortelle par *PsA* (10^7 UFC) après un délai de 2 heures a permis d'obtenir chez les souris WT immunocompétentes une survie de 100 % par rapport au groupe témoin traité par une solution saline

Figure 14 C : Schéma de colonisation de *PsA* bioluminescent dans les poumons de souris vivantes en radiance moyenne au fil du temps

Figure 15 : Schéma de colonisation de l'agent pathogène bioluminescent dans les poumons de la souris, représenté sous la forme d'une radiance moyenne ($p/s^2/cm^2/sr$) en fonction du temps

Figure 16 A : La thérapie monophage (MOI de 10) après un délai de 2 heures a fourni souris Rag2/Il2rg/ déficientes en lymphocytes une survie de 90 % à une infection respiratoire aiguë par *PsA*

Figure 16 B : Radiance moyenne des pathogènes bioluminescents ($p/s^2/cm^2/sr$) dans les poumons de souris vivantes pour indiquer le modèle de colonisation bactérienne et l'activité bactériolytique des phages

Figure 17 : Schéma de colonisation de l'agent pathogène bioluminescent dans les poumons de souris vivantes, représenté par la radiance moyenne en fonction du temps

Figure 18 : La production différentielle de cytokines (Cytokines mesurées par un test immunologique Luminex multi-analytes à microsphères magnétiques similaire à un test Elisa), dans les tissus pulmonaires de la souris après exposition à 10 mg de *Pseudomonas aeruginosa* LPS, de PBS ou de phages (10^9 PFU).

Listes des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de *Pseudomonas* impliquées dans sa virulence et sa persistance

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques morphologiques des phages à partir de l'analyse TEM

Tableau 3 : Biofilms de PA provenant de PAO1 et de 33 isolats de Pa_Ph de la mucoviscidose (CF) après 4 et 24 heures d'exposition.

Tableau 4 : Études sélectionnées sur la thérapie par bactériophages pour le traitement des maladies respiratoires chez l'homme

Tableau 5 : Perte de titre logarithmique des phages PEV1, PEV20 et PEV61 après séchage par pulvérisation en fonction de différentes formulations

Table des matières

1	Avant-propos	1
2	La mucoviscidose	2
2.1	Introduction	2
2.2	Epidémiologie	2
2.3	Symptômes	3
2.4	Complications	3
2.5	Traitements	3
2.5.1	Système respiratoire	3
2.5.2	Système digestif	4
2.5.3	Traitements médicamenteux.....	4
2.5.4	Traitements futurs.....	4
3	Pseudomonas Aeruginosa	5
3.1	Introduction	5
3.2	Acquisition de Pseudomonas	5
3.3	Physiopathologie	6
3.4	Biofilms et quorum sensing	8
3.5	Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques	9
3.5.1	Traitements	9
3.5.2	Nouvelles stratégies thérapeutiques	9
4	Bactériophage	11
4.1	Introduction	11
4.2	Mécanisme d'action	11
4.2.1	Les phages lytiques.....	11
4.2.2	Les phages tempérés.....	12
5	Phagothérapie	13
5.1	Introduction	13
5.2	Différentes approches en clinique	13
5.2.1	La thérapie monophage	13
5.2.2	La thérapie polyphage	14
5.2.3	Administration séquentielle.....	14
6	Phagothérapie contre Pseudomonas aeruginosa	14
6.1	Cas cliniques	14

6.2	Etudes précliniques	16
6.2.1	Utilisation de phages dans des modèles murins d'infections aiguës et chroniques.....	16
6.2.2	Phagothérapie dans le traitement des biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
6.2.3	Conclusion et discussion	29
6.3	Synergie entre la phagothérapie et le système immunitaire	32
6.3.1	Introduction	32
6.3.2	Phagothérapie in vivo chez les souris immunocompétentes.....	33
6.3.3	Apport de différentes composantes de l'immunité dans la phagothérapie	34
6.3.4	Conclusion.....	37
6.4	Voie d'administration	38
6.4.1	Introduction	38
6.4.2	Excipients	39
6.4.3	Conclusion.....	40
7	Etudes cliniques chez l'homme	41
7.1	Etudes en cours chez des patients atteints de mucoviscidose	41
7.2	Etudes cliniques dans la cadre d'infections à pseudomonas.....	43
8	Discussion	44
9	Conclusion	46
10	Méthodologie	48
11	Bibliographie	49
11.1	Articles	49
11.2	Sites internet consultés	52
12	Annexes	53

1 Avant-propos

La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un problème de santé publique majeure, en effet l'OMS a alerté sur le fait que d'ici 2050, si rien n'est fait on pourrait observer un nombre de décès similaires à ce que l'on connaît à l'heure actuelle pour le cancer.

En effet avec l'apparition de bactéries multirésistantes de moins en moins susceptibles aux antibiotiques, on se voit, malgré l'arsenal thérapeutique important mis à notre disposition, de plus en plus démuné face à cette situation.

Ce problème de résistance est plus prépondérant quand il s'agit de traiter des patients atteints de mucoviscidose (ainsi que les patients immunodéprimés).

En effet chez ces derniers, un pathogène particulièrement résistants lors d'infections respiratoires, *pseudomonas aeruginosa*, est responsable de 80% de la mortalité chez ces patients-là. (Rafeeq and Murad 2017) .

Partant de ce constat, l'objectif de ce mémoire sera d'observer une alternative thérapeutique à l'antibiothérapie.

On se penchera alors, sur une thérapie ancienne nouvellement revenue au premier plan : la Phagothérapie.

L'objectif sera alors de passer en revue la littérature scientifiques et les différentes études en cours chez l'homme permettant de justifier son utilisation potentielle lors d'infections respiratoires à *pseudomonas aeruginosa* chez des patients atteints de mucoviscidose.

2 La mucoviscidose

2.1 Introduction

La Mucoviscidose est une maladie autosomique récessive qui va impacter des cellules dont le rôle est la production de mucus (et de sueurs), l'atteinte au niveau pulmonaire est la plus grave et entraîne la mort de 80% des patients. Aujourd'hui plus de 1900 mutations du gène codant pour le canal CFTR ont été identifiées dont la mutation « F508del » qui est la plus commune d'entre elles (Rafeeq and Murad 2017) (Kerem, Rommens et al. 1989).

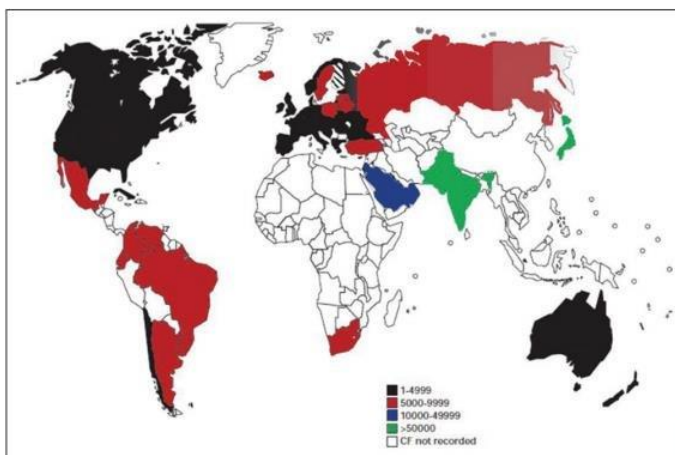
Une mutation du gène codant pour le canal CFTR implique une perturbation des échanges ioniques et l'on observe alors un mucus plus épais et visqueux qui obstrue les voies respiratoires ce qui entraîne de graves infections pulmonaires, en particulier celle à *pseudomonas* (Misbahuddin M. Rafeeq et al ,2017).

Dans le tube digestif, le mucus épais obstrue les canalicules du pancréas et le canal de la vésicule biliaire, empêchant l'écoulement des enzymes et de la bile dans le duodénum, ce qui provoque des anomalies de malabsorption et de digestion (Rafeeq and Murad 2017) .

2.2 Epidémiologie

La CF est traditionnellement définie comme la maladie héréditaire potentiellement mortelle la plus courante chez les enfants des populations caucasiennes, avec une incidence de 1/2500 des naissances en Europe et en Amérique du Nord.

Dans les populations asiatiques, l'existence de la CF est maintenant mieux établie, mais son



incidence reste sous-estimée dans la plupart des pays. Elle semble plus élevée au Moyen-Orient (où la consanguinité est fréquente) qu'en Asie orientale (Scotet, L'Hostis et al. 2020).

Figure 1 Taux d'incidence annuelle mondiale de la mucoviscidose, exprimé en nombre de naissances d'enfants sains pour une naissance d'enfant atteint (OMS) (researchgate.net).

2.3 Symptômes

La présentation classique de la CF est l'insuffisance respiratoire ou les troubles gastro-intestinaux (GI) chez le nourrisson.

Les symptômes les plus courants chez les enfants sont une toux chronique et une respiration sifflante associée à une malabsorption dans le tube digestif et à un retard de croissance. Les nourrissons peuvent présenter un iléus méconial, ce qui peut aider à poser le diagnostic (Rafeeq and Murad 2017) .

2.4 Complications

Au niveau respiratoire on peut observer de la bronchectasie, des infections chroniques à *pseudomonas*, *Haemophilus influenza* ainsi qu'à *staphylococcus aureus* conduisant à une pneumonie, des excroissances (polypes nasaux), de l'hémoptysie, un pneumothorax et la maladie pourrait finalement amener à une insuffisance respiratoire.

Au niveau digestif on observe des carences nutritionnelles, notamment en graisses et en vitamines liposolubles, et la survenue de diabète.

En plus de cela un dysfonctionnement hépatique progressif, des calculs biliaires, une obstruction intestinale, une invagination, une prolifération bactérienne dans l'intestin grêle et un syndrome d'obstruction intestinale distale peuvent également se manifester (Rafeeq and Murad 2017) (Brown, White et al. 2017) .

Les autres complications peuvent inclure l'infertilité, l'ostéoporose, les déséquilibres électrolytiques et la déshydratation qui se manifestent par une accélération du rythme cardiaque, de la fatigue ainsi que de l'hypotension (Brown, White et al. 2017) (Rafeeq and Murad 2017).

2.5 Traitements

2.5.1 Système respiratoire

1) Antibiotiques pour prévenir et contrôler les infections respiratoires à *pseudomonas*.

- 2) Pour le contrôle de l'inflammation des voies respiratoires : Antiinflammatoire non stéroïdiens, stéroïdes inhalés et systémiques et cromolyn.
- 3) Pour réduire la viscoélasticité et faciliter l'élimination du mucus : β -agonistes inhalés avec de l'oxygène humidifié ; une solution saline hypertonique à 3-6 % (Brown, White et al. 2017).

2.5.2 Système digestif

- 1) Pour prévenir ou traiter les occlusions intestinales : réhydratation orale et laxatifs osmotiques et des lavements de contraste hyperosmolaires
- 2) Insuffisance pancréatique : thérapie de remplacement de l'enzyme pancréatique (PERT) contenant des combinaisons multiples de protéases, lipases et amylases (Brown, White et al. 2017).

2.5.3 Traitements médicamenteux

Ivacaftor : L'Ivacaftor restaure l'activité du canal chlorure de la protéine CFTR à la surface de la cellule, laissant le canal CFTR s'ouvrir correctement.

Il est utile chez les patients de plus de 6 ans présentant un certain type de mutations (soit 4% des malades) (Brown, White et al. 2017).

2.5.4 Traitements futurs

En plus des options thérapeutiques disponibles, les chercheurs cherchent à développer des traitements qui ciblent la mutation génétique à l'origine de la CF.

Des médicaments sont en cours de développement pour cibler et corriger le mauvais fonctionnement de la protéine CFTR comme l'ataluren, qui a fait l'objet d'études cliniques en 2017 (Brown, White et al. 2017) .

Ces études n'ont pas abouti. Cependant, en 2020 des chercheurs ont tenté de vérifier si l'échec clinique n'était pas dû à l'administration chronique d'aminoglycosides inhalés chez ces patients. Ils en ont finalement conclu que ce traitement ne permettait pas de soigner les patients atteints de mucoviscidose (Konstan, VanDevanter et al. 2020) .

3 Pseudomonas Aeruginosa

3.1 Introduction

Pseudomonas aeruginosa (*PsA*) est un pathogène opportuniste qui se révèle être l'une des causes principales de morbidité et de mortalité chez des patients atteints de mucoviscidose. Il représente, en effet, 80 % des infections respiratoires chez ces patients (Oliveira, Bim et al. 2020).

Son éradication au niveau pulmonaire est devenue de plus en plus compliquée du fait de sa capacité à développer des résistances à l'antibiothérapie (Pang, Raudonis et al. 2019).

En effet, l'OMS a considéré la souche de *PsA* résistante aux carbapénèmes comme l'une des espèces bactériennes pour lesquelles il est critique de développer de nouveaux médicaments (Tacconelli, Carrara et al. 2018) .

La découverte et le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques revient donc à l'ordre du jour et notamment celle de la phagothérapie.

3.2 Acquisition de Pseudomonas

Une infection à *PsA* chez les patients atteints de Mucoviscidose commence très tôt dans la vie et est souvent associée à un mauvais pronostic (Douglas, Brennan et al. 2009).

Elle apparaît en général à l'âge de 2 ou 3 ans mais peuvent survenir beaucoup plus tôt à l'âge de 3 mois (Vaitekenas, Tai et al. 2021).

Il est suggéré que l'environnement naturel est la principale source de contamination précoce car une analyse génétique a montré que la plupart des primo infections précoces provenait de souches similaires de *PsA* trouvés dans l'environnement (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016).

L'importance de la cavité nasale comme réservoir de *PsA* est de plus en plus reconnue et soutient l'hypothèse selon laquelle les bactéries migrent des sinus vers les voies respiratoires inférieures ce qui implique une source importante de réinfection après son éradication de voies respiratoires inférieures (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016).

Détecter l'infection à un stade précoce permet d'obtenir une éradication de *PsA* dans plus de 60 % des cas grâce à l'antibiothérapie.

Toutefois un schéma d'infection intermittent et chronique persiste malgré les traitements chez une bonne partie des patients (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016) .

3.3 Physiopathologie.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'ascenseur mucociliaire, principal mécanisme de défenses inné des voies respiratoires, est altéré et a pour conséquence l'accumulation de mucus au sein duquel les bactéries peuvent se développer. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer la vulnérabilité spécifique des voies respiratoires chez ces patients à l'infection par *PsA* (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016).

La séquence d'évènements qui se produit à la suite de l'inhalation d'un petit inoculum de *PsA* au niveau des voies respiratoires reste encore inconnue. Cependant, comme dans la plupart des autres infections bactériennes, on suppose que l'adhésion et la résistance aux défenses innées sont des facteurs clés (Davies 2002).

Il a été proposé également que la protéine CFTR agit comme un récepteur pour *PsA* pour son internalisation ce qui entraîne ensuite la destruction de l'épithélium.

Il est important de noter que *PsA* possède un large éventail de facteurs de virulence (Tableau 1) qui lui permet de s'adapter et de persister dans les voies respiratoires des patients atteints de CF (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016).

Ces facteurs comprennent des structures de surface telles que le lipopolysaccharide (LPS) (facteur très immunogène), les flagelles et les pili de type IV, qui contribuent à la pathogénicité et déclenchent l'activation immunitaire de l'hôte.

Les flagelles et les pili de type IV sont importants pour l'attachement à l'épithélium et la formation de biofilms.

La flagelline, par sa liaison à des récepteurs TLR, est capable de stimuler la production de TNF alpha (facteurs de nécroses tumorales) et d'autres cytokines pro-inflammatoires. Elles déclenchent donc la réponse immunitaire de l'hôte. C'est pour ça que dans les stades tardifs de l'infection on observe une régulation à la baisse de la synthèse des flagelles.

Les protéines sécrétées constituent un élément majeur de la virulence de *Pseudomonas*.

Les protéases, les toxines et les hémolysines dégradent les tissus de l'hôte et perturbent la réponse inflammatoire. L'exotoxine A est une exotoxine qui inhibe la synthèse des protéines dans les cellules eucaryotes.

La pyocyanine (responsable pigmentation bleue verte de *Pseudomonas*) et l'acide cyanhydrique sont responsables d'une diminution de la fréquence des battements ciliaires, ce qui peut nuire d'avantage aux mécanismes de défenses innés des voies respiratoires.

Enfin, on a le système de sécrétion de type 3, dont 4 protéines effectrices ont été décrites (ExoS, ExoT, ExoU, et ExoY). Les souches sécrétant l'ExoU provoquent une lyse plus rapide des cellules hôtes, et les souches sécrétant l'ExoS induisent l'apoptose.

NB : P.A mucoïde est un phénotype mutant qui se développe à un stade ultérieur qui produit de l'exopolysaccharide /alginate lui conférant ainsi une résistance à la phagocytose et aux antibiotiques (Li, Kosorok et al. 2005).

Table 1. Characteristics of *P. aeruginosa* involved in virulence and persistence within the CF lung.

<i>P. aeruginosa</i> virulence factors
Surface structures
Lipopolysaccharide
Flagella
Pili
Extracellular products
Proteases
Hemolysin
Exotoxin A
Pyocyanin
Hydrogen cyanide
Type 3 secretion
ExoS
ExoT
ExoU
ExoY
Antibiotic resistance
Quorum sensing
Biofilm growth
Mucoïdy

Tableau 1 caractéristiques de *pseudomonas* impliquées dans sa virulence et sa persistance (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016)

Quelle est la réponse de l'hôte face à l'infection ?

➔ Une combinaison de défenses innées et de réponses inflammatoires inefficaces de l'hôte permet la persistance de P.A. (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016)

Chez les adultes on observera une augmentation du nombre de neutrophiles et d'interleukines (IL8) qui, par le contexte inflammatoire engendré, vont participer au déclin de la fonction pulmonaire. (Gibson, Burns et al. 2003)

De plus, la libération de l'élastase des neutrophiles et d'autres protéases entraîne la digestion des composants structurels du poumon et la dégradation des

immunoglobines causant une destruction des tissus et limitant la réponse immunitaire (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016).

3.4 Biofilms et quorum sensing

Développement du biofilm en milieu hypoxique (mucus du malade). Les biofilms sont caractérisés par des amas de structure bactérienne entourés d'une matrice constituée de polymères adhérent à une surface (Thi, Wibowo et al. 2020). Ce phénomène de passage au mode de vie biofilm est influencé par un système de signalisation intracellulaire qui permet la communication entre bactéries et nommé quorum sensing. (Lund-Palau, Turnbull et al. 2016) Son développement se fait selon 5 étapes distinctes :

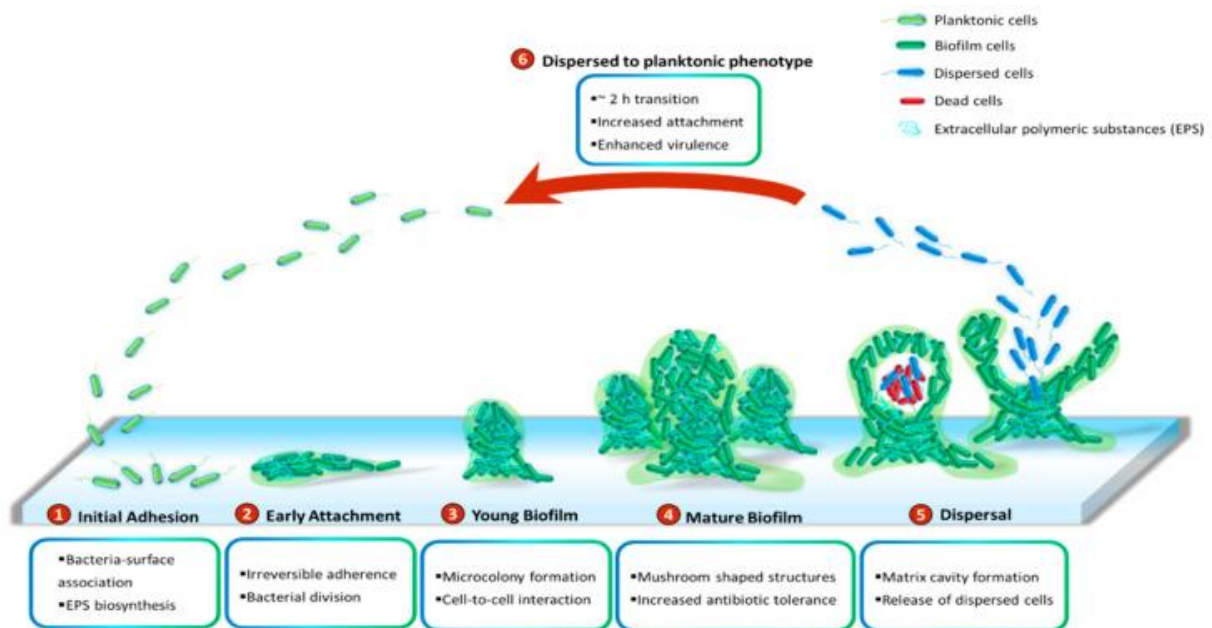


Figure 2 : Etapes du développement des biofilms (Thi, Wibowo et al. 2020)

- Adhérence de la bactérie à la surface
- Passage d'une fixation réversible à une fixation irréversible
- Organisation progressive des bactéries en une architecture structurée

- d) Leur développement mène à des structures tridimensionnelles similaire aux structures des champignons
- e) Enfin au centre du biofilm il y a une autolyse qui provoque la libération des cellules dispersées avec un passage au mode dit planctonique pour infecter les espaces non colonisés.

3.5 Traitement et nouvelles stratégies thérapeutiques

3.5.1 Traitements

- Primo- infection : il est nécessaire d'établir un protocole de détection et de traitement dès sa première acquisition, c'est-à-dire réaliser une culture de routine des crachats expectorés des patients.

Les traitements d'une primo-infection sont :

- a) La tobramycine inhalée seule 300 mg 2 fois par jour pendant 28 jours.
- b) L'aztréonam lysine inhalée (comme alternative) à 75 mg 3 fois par jour pendant 28 jours. Cet antibiotique est prescrit si le patient ne tolère pas la tobramycine, si le patient se détériore ou alors si c'est une préférence du patient.
- c) Colistin inhalée :150 mg 2 fois par jours durant 28 jours tout en alternant avec 28 jours sans traitements.

Traitement continu d'antibiotiques par alternance : Pour les patients dont l'état se détériore ou qui présentent des exacerbations, il est souvent prescrit 2 antibiotiques en alternance chacun pendant une durée de 28 jours (Richard H Simon, MD, 2021).

3.5.2 Nouvelles stratégies thérapeutiques

- A) **Inhibition du Quorum sensing** : Cette approche nous permettrait de prévenir ou de réduire la formation du biofilm et diminuer la virulence bactérienne. De plus cette approche agit selon un spectre étroit qui aurait peu d'impact sur les bactéries de la flore commensale.
- b) **Inhibition de la lectine** : Les lectines sont des protéines de la membrane externe permettant l'adhérence de la bactérie à l'épithélium de surface cellulaire. De plus elles

sont impliquées dans la formation de biofilms en interagissant avec les cellules de l'hôte.

Inhiber la lectine pourrait être utilisé en prévention et en traitement avec un faible risque de résistance.

C) Chélation du fer : Le fer est un élément essentiel pour la croissance et la maturation bactérienne. Les crachats des patients atteints de mucoviscidose ont montré une concentration élevée en fer comparées à ceux des individus sains.

Limiter la concentration extracellulaire en fer pourrait contrer les infections à *Pseudomonas*. Le gallium est un analogue du fer III qui perturbe le métabolisme ferrique bactérien en agissant comme un substitut du fer dans de nombreux processus biologiques. Malheureusement, les patients recevant des composés de gallium tels que le nitrate de gallium et l'arséniure de gallium pour un traitement médical peuvent présenter une immunosuppression et une toxicité pour divers organes, notamment les poumons et les reins.

D) Stratégie vaccinale : Comme les antigènes de *pseudomonas aeruginosa* suscitent des réponses immunitaires puissantes, il serait possible de développer un vaccin pour prévenir l'infection. Les vaccins actuels ne sont pas efficaces à cause de la capacité de cet agent pathogène à subir des changements phénotypiques dans des conditions environnementales différentes.

E) Nanoparticules : Actuellement les nanoparticules ont gagné l'attention du monde scientifique pour le traitement du cancer et des maladies infectieuses.

Ces nanoparticules utilisées pour leurs activités antiinfectieuses ont une très haute pénétrabilité membranaire bactérienne, peuvent altérer les biofilms et sont de plus impliquées dans de nombreux mécanismes antibactériens.

Le problème principal dans leur utilisation est leur potentiel toxique chez l'homme.

F) Peptides antimicrobiens : Produits par une grande variété de microorganisme et dont le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé, ces peptides cibleraient la membrane cytoplasmique menant ainsi à la mort cellulaire.

G) Phagothérapie (discuté plus loin).

(Pang, Raudonis et al. 2019).

4 Bactériophage

4.1 Introduction

Les phages sont des virus naturels qui possèdent la capacité d'infecter spécifiquement les bactéries. Ils se trouvent être abondants et omniprésents sur terre, en effet il est connu à l'heure actuelle que les phages sont l'organisme le plus répandu sur terre.

De plus les bactériophages font preuve d'une remarquable diversité au niveau de leur taille, de leur forme et du génome qu'ils contiennent (Keen 2015).

Cette diversité explique leur importance dans une variété de processus biologiques et environnementaux. Les phages tueraient et lyseraient entre 15 et 40 % des bactéries de l'océan chaque jour, ce qui influence le taux de productivité des phytoplanctons, la production d'oxygène et peut être même le climat (Keen 2015).

De plus, ils participent à l'évolution bactérienne par leur activité lytique exercée sur les bactéries mais également parce que les phages sont des agents importants de transfert horizontal de gènes. Toutefois cette capacité de transfert du matériel génétique peut convertir certaines bactéries commensales (ou inoffensives) en pathogènes virulents. A l'opposé de cela, les phages qui colonisent les surfaces des muqueuses agissent essentiellement comme un composant supplémentaire de l'immunité innée (Keen 2015).

Il y a près de 100 ans Félix d'Hérelle, célèbre Biologiste français, envisageait leur utilisation comme agent anti-infectieux, et bien que l'émergence des antibiotiques ait conduit à l'abandon de la phagothérapie, aujourd'hui cette thérapie connaît un regain d'intérêt du fait de l'émergence de la résistance aux antibiotiques (Chanishvili 2012).

4.2 Mécanisme d'action

4.2.1 Les phages lytiques

Les phages lytiques vont donc se lier de manière spécifique à la surface de la bactérie, y injecter leur matériel génétique et utiliser les mécanismes de reproduction pour se répliquer. Enfin, la bactérie est lysée en libérant les phages nouvellement formés (Pirnay, De Vos et al. 2011).

La plupart des phages lytiques utilisent deux types de protéines pour détruire leur cellule hôte, les holines et les lysines. Les holines perforent la membrane cytoplasmique bactérienne en synergie avec les endolysines.

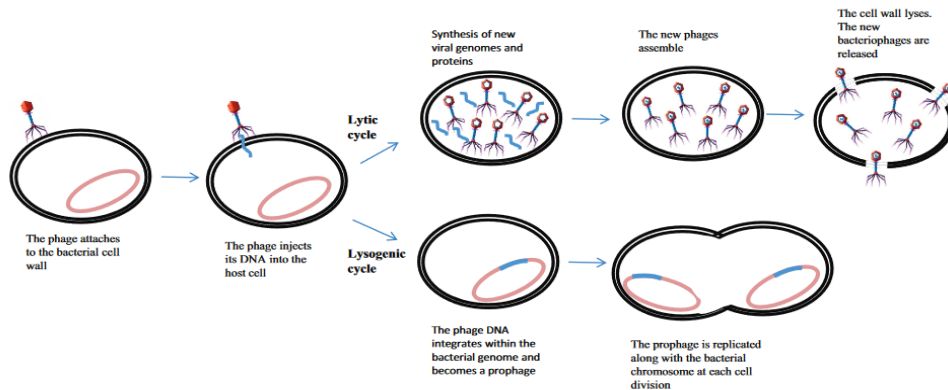


Figure 3 Aperçu des principales différences entre le cycle de vie du bactériophage lytique et celui du bactériophage lysogène (Kakasis and Panitsa 2019)

4.2.2 Les phages tempérés

Certains phages vont initier un cycle lysogène où le virus est à un stade de prophage et passe occasionnellement dans un cycle lytique sous l'effet d'un stimulus {Kakasis, 2019}

Ce sont les phages dits tempérés. Pour ces derniers, les guidelines actuelles expliquent la nécessité de les éviter lors d'une stratégie thérapeutique par phages. En effet, la principale préoccupation est l'aptitude des phages tempérés à assurer le transfert horizontal de gènes entre les génomes bactériens par transduction généralisée et spécialisée. Dans le cas de la transduction généralisée, des fragments d'ADN bactérien sont empaquetés dans la capsid virale pendant l'assemblage du phage à l'intérieur de la cellule et sont transférés à des nouveaux hôtes après l'assemblage (Monteiro, Pires et al. 2019). Ce type de transduction peut également être effectué par des phages lytiques et est donc difficile à éviter. Dans la transduction spécialisée, qui se produit fréquemment avec les phages tempérés, les gènes adjacents au génome du phage dans le chromosome bactérien peuvent être excisés par erreur avec le génome du phage et intégrés dans le chromosome des hôtes bactériens nouvellement infectés (Monteiro, Pires et al. 2019).

5 Phagothérapie

5.1 Introduction

La Phagothérapie est définie comme l'administration de phages virulents directement au patient de façon à traiter une infection par la lyse bactérienne.

Comme dit précédemment, le premier scientifique à parler de « bactériophage » et d'envisager leur utilisation dans la thérapie anti-infectieuse fut Felix d'Herelle (Fernando L. et al 2019).

Cependant malgré des résultats encourageants lors des premiers rapports sur l'efficacité de la phagothérapie, la recherche a vite été abandonnée dans nos sociétés occidentales au vu de l'essor du développement des antibiotiques. Toutefois cette thérapie, dans certains pays de l'ex-union soviétique tels que la Georgie et la Pologne, a connu un essor constant et y bénéficie d'institut spécialisé (Gordillo Altamirano and Barr 2019).

Au vu des problèmes de résistances aux antibiotiques auxquels l'humanité fait face à l'heure actuelle, la phagothérapie connaît un regain d'intérêt par la nécessité de trouver des alternatives à l'antibiothérapie.

5.2 Différentes approches en clinique

5.2.1 La thérapie monophage

Elle implique l'utilisation d'un seul type de phage, elle est utilisée lors des études précliniques pour faire la preuve de son efficacité ou alors également dans certaines circonstances ou en clinique en veillant à une correspondance minutieuse entre les pathogènes et les isolats de phages individuels.

Les phages sont souvent obtenus à partir de banque de phages qui sont des collections d'isolats de phages précédemment caractérisés (Chan, Abedon et al. 2013).

Néanmoins, l'utilité de la thérapie monophasique dans la pratique clinique peut être entravée par l'émergence d'une résistance bactérienne aux phages (Gordillo Altamirano and Barr 2019).

5.2.2 La thérapie polyphage

Également connue sous le nom d'utilisation de cocktails de phages, la thérapie polyphage est une stratégie couramment utilisée et peut être conçue pour cibler une seule souche bactérienne, plusieurs souches d'une même espèce ou plusieurs espèces généralement regroupées en fonctions des différents syndromes cliniques.

L'inconvénient principal dans cette thérapie est la complication des processus de préparation et de purification qui augmente le risque d'erreur de manipulation, ce qui impliquera alors une pharmacocinétique et pharmacodynamie peu prévisible (Gordillo Altamirano and Barr 2019).

5.2.3 Administration séquentielle

Une dernière approche combine les notions de thérapies monophages et polyphages en utilisant l'administration séquentielle de cocktail de phages (Gordillo Altamirano and Barr 2019).

Alex R. Hall et al ont comparé l'administration séquentielle et simultanée de phages dirigés contre des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans des modèles in vitro de larves de fausse teigne.

Ils ont observé que l'application simultanée était systématiquement égale ou supérieure en termes de réduction de la charge bactérienne et il n'y avait aucune différence en termes de minimisation de la résistance.

Cela est vrai si les phages utilisés ciblent différents récepteurs bactériens de manière à minimiser la fréquence de cross résistances (Hall, De Vos et al. 2012).

6 Phagothérapie contre *Pseudomonas aeruginosa*

6.1 Cas cliniques

En juin 2016, un homme de 61 ans fut atteint de gangrène ayant entraîné l'amputation des membres inférieurs à la suite d'une infection compliquée à *Enterobacter cloacae* (Pirnay, De Vos et al. 2011).

Après un transfert à l'hôpital militaire reine Astrid, on remarque dans les cultures la présence de *PsA* multirésistant. Un peu plus tard le patient développe une septicémie à *Pseudomonas* uniquement sensible à la Colistine.

Cette septicémie induisit une augmentation du rythme cardiaque, une diminution de la pression sanguine de la fièvre ainsi qu'une CRP très élevée. De plus le traitement antibiotique a conduit le patient vers une insuffisance rénale aigüe ce qui força les médecins à tempérer l'utilisation d'antibiotiques.

Par manque d'alternatives thérapeutiques chez ce patient les médecins se sont tournés vers l'utilisation de la phagothérapie.

Résultat → Après l'utilisation de cocktails contenant des bactériophages, ayant une activité in vitro à l'égard de cette souche de *pseudomonas*, 6 heures pendant 10 jours en IV : La culture bactérienne était devenue négative, les taux de CRP avaient diminué et la fièvre avait disparu, l'hémodiafiltration fut arrêtée, et enfin aucun effet secondaire ne fut constaté (Pirnay, De Vos et al. 2011).

Un autre cas clinique rapporté dans la littérature qui nous intéresse plus particulièrement est celui d'un patient de 26 ans atteint de mucoviscidose qui était sur la liste d'attente d'une transplantation pulmonaire et qui a développé une infection respiratoire à *PsA* multirésistante (Law, Logan et al. 2019).

En premier lieu, elle a été prise en charge par des antibiotiques pendant 4 semaines : colistine et azithromycine durant les 4 semaines, piperacilline-tazobactam les deux premières semaines et carbapénème la dernière semaine.

Malgré ces traitements antibiotiques, la patiente était incapable de se déplacer seule.

Une semaine après l'arrêt du traitement, elle a développé de la fièvre, des expectorations ainsi que des besoins en oxygène. Les médecins l'ont donc remise sous perfusion d'antibiotiques mais malgré cela, elle a développé une insuffisance rénale (dû à la colistine) ainsi qu'une insuffisance respiratoire.

Il a donc été décidé de tester chez cette patiente l'AB-PAO1, cocktail de 4 phages, avec une administration toutes les 6 heures pendant 8 semaines de manière concomitante avec la ciprofloxacine, la piperacilline et le tazobactam.

Au début la patiente recevait un supplément d'oxygène de 30L/min.

Au jour 7 la patiente n'avait plus de fièvre mais avait du mal à expectorer, cependant sa pneumonie s'était cliniquement résolue.

En fin de traitement la patiente n'avait besoin d'oxygène qu'à un taux de 3L/min, n'avait plus d'expectoration et pouvait se déplacer.

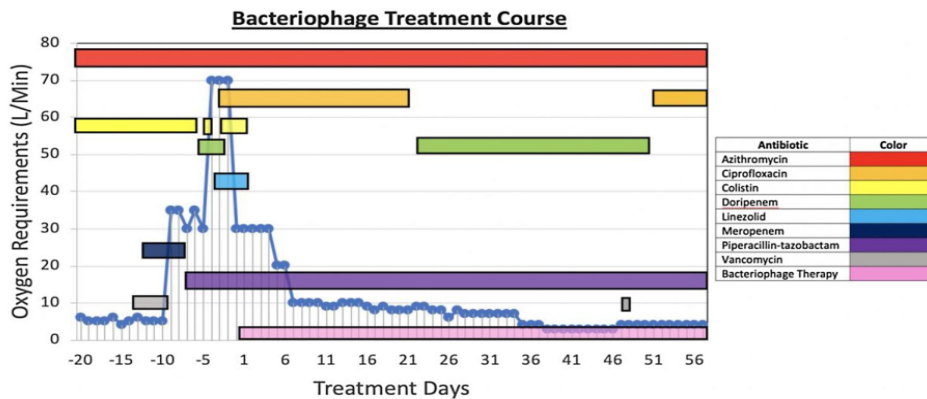


Figure 4 Saturation en oxygène et utilisation d'antibactériens au cours de l'évolution clinique de notre patient (Law, Logan et al. 2019)

La fièvre avait disparu et n'est pas réapparue durant le traitement. En plus de cela elle n'a pas eu de récurrence de *PsA* et d'exacerbation de sa mucoviscidose dans les 100 jours qui ont suivi la fin de la phagothérapie.

Elle a pu subir 9 mois plus tard une transplantation pulmonaire avec succès. (Law, Logan et al. 2019)

La phagothérapie aurait donc permis chez ces patients de traiter une infection à *Pseudomonas* multirésistantes. Malgré le caractère encourageant de ces cas cliniques, il ne s'agit que de cas isolés et des études systématiques, contrôlés, sont nécessaires pour confirmer l'effet bénéfique de la phagothérapie.

La question qui se pose maintenant est de savoir quel élément de la littérature scientifique nous permettrait d'émettre une hypothèse favorable quant à l'utilisation des phages à l'égard d'une infection à *PsA* multirésistante ? Et plus particulièrement dans le cadre des infections respiratoires ?

6.2 Etudes précliniques

6.2.1 Utilisation de phages dans des modèles murins d'infections aiguës et chroniques

Lors d'une étude préclinique Feng Chen et al ont utilisé des modèles d'infections bronchopulmonaires aiguës et chroniques à *PsA* chez la souris (Chen, Cheng et al. 2021).

Pour le modèle d'infection aiguë, les chercheurs ont utilisé une souche du laboratoire PAO1 et un isolat clinique multirésistant W19. En ce qui concerne le modèle d'infection chronique, ils ont utilisé un isolat clinique FRD1, une souche de phénotype mucoïde qui s'est distinguée par son rendement élevé en mucus des expectorations d'un patient atteint de mucoviscidose. Enfin, ils ont criblé, isolé et nommé différents phages qui agissaient sur ces différentes souches et les ont ensuite caractérisés (tableau 2) : HX1, MYY9, MYY16, TH15.

Phage	Host	Mean capsid diam (nm) ± SD	Mean tail length (nm) ± SD	Family	Order
HX1	PAO1	51.46 ± 2.89	15.00 ± 1.42	Podoviridae	Caudovirales
MYY9	PAO1	54.70 ± 2.17	28.10 ± 0.98	Podoviridae	Caudovirales
MYY16	PAO1	57.50 ± 3.52	17.17 ± 1.57	Podoviridae	Caudovirales
TH15	ATCC 27853	68.38 ± 3.31	99.72 ± 3.81 (contractile)	Myoviridae	Caudovirales

Tableau 2 résumé des caractéristiques morphologiques des phages à partir de l'analyse TEM

Ces phages ont tout d'abord prouvé leur efficacité dans des modèles d'infection in vitro avant d'être testés dans des modèles animaux notamment chez la souris.

- a) Lors de cette étude la phagothérapie a permis de réduire la charge bactérienne dans les poumons des souris atteints de pneumonies aiguës :

Ces expériences ont été réalisées afin de mettre en exergue la capacité des phages à réduire la charge bactérienne dans les poumons des souris infectés.

Pour ce faire, une instillation intratrachéale de PAO1 a été réalisée chez la souris à une dose de 4×10^6 CFU ce qui a permis une dissémination systémique de la bactérie dans les 24 heures.

On observe, chez le groupe traité, une diminution significative du nombre de bactéries d'approximativement 3,21 unités logarithmiques pour les phages MYY9 et HX1 (Figure 5a).

La limite inférieure de détection étant de 2 unités logarithmique.

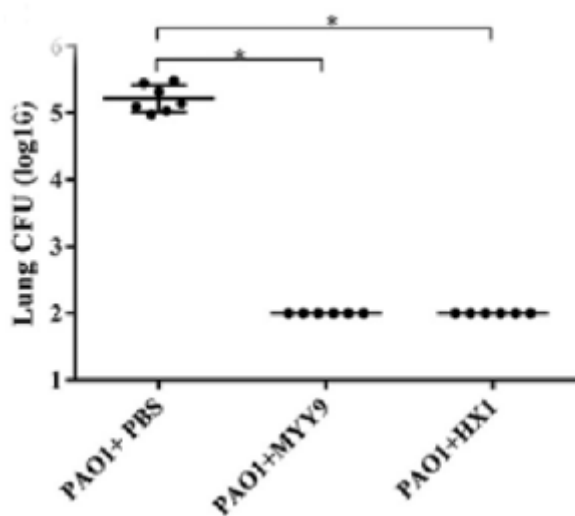


Figure 5A Efficacité antibactérienne d'une instillation intratrachéale des phages HX1 et MYY9 contre les infections à pseudomonas dans les modèles de pneumonies aiguës de souris (Chen, Cheng et al. 2021).

Ils ont ensuite voulu déterminer la quantité de phages dans les poumons infectés pour examiner si la réplication des phages peut se produire dans le poumon. Et on constate que le titre phagique dans les poumons infectés a augmenté par rapport à celui des contrôles (Figure 5b).

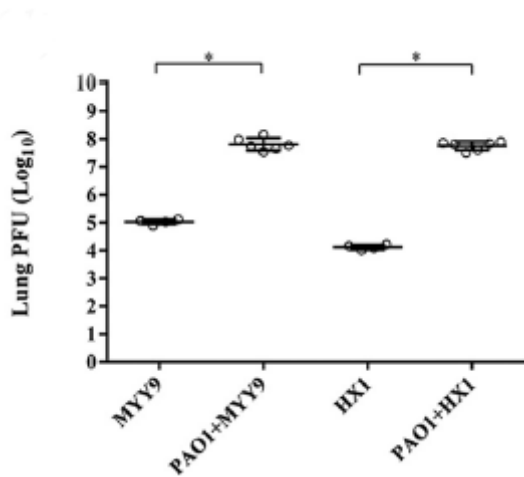


Figure 5b Titre phagique dans les poumons infectés chez la souris après un traitement par instillation intratrachéale. (Chen, Cheng et al. 2021)

Ils ont donc, par ces expériences, montré que les phages étaient capables de se multiplier en présence des bactéries au niveau pulmonaire, et par conséquent de diminuer de manière significative la charge bactérienne dans des modèles de pneumonie aiguë à *PsA* chez la souris.

b) La phagothérapie atténue la charge bactérienne et la réponse inflammatoire dans de modèles de pneumonie chronique chez la souris :

Comme discuté plus haut, on sait que le contexte inflammatoire, engendré par les infections chroniques à *PsA*, va participer au déclin de la fonction pulmonaire.

Il se trouve que lors de leurs expériences, Cheng et al ont étudié l'impact d'une instillation de phages sur la réponse inflammatoire.

Pour ce faire, ils ont tout d'abord déterminé la dose qui garantit une colonisation bactérienne efficace par la souche FRD1 (isolat clinique utilisé dans les modèles d'infections chroniques) en absence de mortalité par des essais expérimentaux répétés.

Ils ont ensuite testé l'efficacité du phage MYY9 à l'égard de la souche FRD1.

On observe, 3 jours, post infection une réduction statistiquement significative de la charge bactérienne dans le groupe traité par les phages par rapport au groupe contrôle traité au PBS (figure 6).

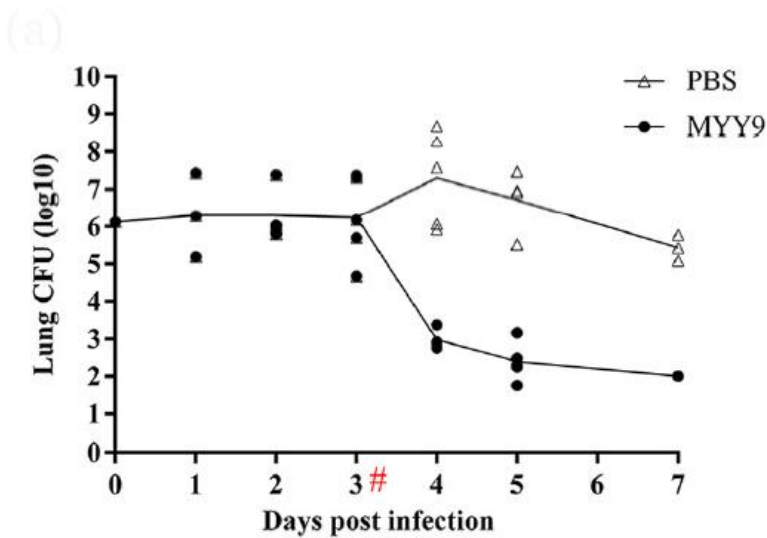


Figure 6 Courbe de la charge bactérienne (CFU) dans les poumons infectés en fonction du temps dans le groupe contrôle (PBS) et le groupe traité par le phage MYY9. (Chen, Cheng et al. 2021)

Dans cette expérience, les chercheurs ont alors étudié l'impact de la phagothérapie sur la réaction inflammatoire. L'instillation de phages, en absence de bactéries, a montré une légère augmentation des cytokines inflammatoires que sont les TNF- α et IL-6 par rapport au contrôle.

Toutefois la synthèse et la libération de ces cytokines inflammatoires sont réduites dans le groupe traité par les phages par rapport au groupe FRDI (non traité par les phages), ce qui indique que les bactériophages contribuent à atténuer les réactions inflammatoire (figure 7).

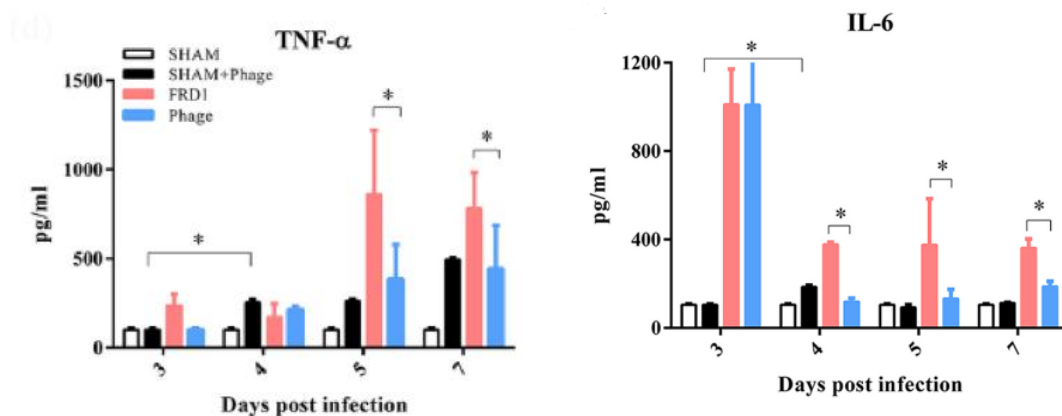


Figure 7 Dynamique de la concentration de biomarqueurs inflammatoires sélectionnés (TNF- α et IL-6) dans le BALF (Bronchoalveolar Lavage Fluid) au fil du temps mesuré par Elisa. FRDI représente un isolat clinique de *pseudomonas aeruginosa* utilisé dans le cadre de modèles murins d'infections chroniques. Sham représente le contrôle permettant de comparer les effets secondaires dans les différents groupes. Phage représente FRDI en présence de phages.

La phagothérapie permettrait donc, en plus de diminuer la charge bactérienne, d'atténuer la réaction inflammatoire lors d'une infection bactérienne à *PsA*.

6.2.1.1 Utilisation de Cocktail de phages contre pseudomonas

La résistance bactérienne aux phages peut se produire à chaque étape du cycle de vie du phage depuis : (I) la reconnaissance et la liaison des récepteurs, (II) l'injection du génome, (III) la réplication de l'ADN, (IV) la transcription et la traduction, (v) l'assemblage du phage, et (VI) la libération du phage. L'évolution de cette résistance est très rapide, de même que l'évolution des phages en réponse aux changements bactériens (Vaitekenas, Tai et al. 2021). Cette évolution rapide des phages et des bactéries est donc fortement susceptible d'impacter une thérapie par phage unique. C'est pourquoi il est intéressant alors d'utiliser de cocktail de phages capables de combler le manque d'efficacité d'un phage unique. C'est ce qui a été réalisé dans une étude parue en 2018 de Francesca Forti et al (Forti, Roach et al. 2018).

En effet ils ont étudié l'application de cocktails de phages notamment pour traiter une pneumonie aiguë dans des modèles murins.

Pour ce faire, ils ont isolé et testé l'efficacité de 23 phages sur 58 souches de *PsA*. Sur base de leurs gammes d'hôte, c'est-à-dire le nombre de souches sur lesquelles chaque phage présente une action bactéricide, et dans le but d'assembler des virions qui présentent une grande diversité génétique, ils ont pu sélectionner 6 phages qui constitueront leur cocktail : PYO2, DEV, E215, E217, PAK_P1, et PAK_P4.

Ce cocktail a tout d'abord été testé in vitro contre des souches de pseudomonas isolées provenant de patients italiens atteints de mucoviscidose, de patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, ainsi que des patients non atteints de mucoviscidose. Le cocktail ainsi réalisé devait en théorie infecter au moins 97 % des souches de pseudomonas.

Les auteurs de cette étude ont tout d'abord comparé, in vitro, l'infection par phage unique et l'infection par le cocktail de phages.

BACTERIAL STRAIN	EFFICIENCY OF PLATING OF						
	PY02	DEV	E215	E217	PAK_P1	PAK_P4	COCKTAIL
PAO1	+	+	+	+	-	-	+
PA14	+/-	-	-	-	-	-	-
PAK-lumi	+	+	+	+	+	+	+
PAO1 pilA	+	+	+	+	-	-	+
LESB58	-	+	-	-	-	-	-/+
E1	+/-	-	+	+	-	-	+
E2	+	+	-	-	-/+	-	+/-
E4	-	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	-/+	-	-/+	-/+	-/+
E9	-	-	-	-	-/+	+/-	-/+
AG5	+	+	+	+	-/+	+/-	+/-
GS3	+	+	+	+/-	+	+	+
AA10	+	+	-	-	-	-	+/-
GJY9	-	+/-	-/+	-	-	-	-/+
CL1	-	+	+/-	-	-	-	+/-
CL2	-	+	+/-	+	-/+	-	-/+
VR8	+	+/-	+	+	+	-	+
AG6	-	-	+	-	-	-	+/-
DV4	+	+	-	-	-/+	+/-	+/-
GA7	+	-	-/+	+T	+	+	+
AA2	+/-	-	-/+	-/+	-	-/+	-/+
AA43	+	+/-	+	+	-	-	+
AA44	+	-/+	+/-	+	-	-	+/-
TR1	+	+	-	-/+	-	-	+
TR66	+	+/-	-	-	-	-	-/+
TR67	+	+	-	-	-	-	-
PaPh1	+/-T	+	-	-	-	-	+/-
PaPh2	-	-	-	+/-	-	-	-
PaPh3	+	+	-	-/+	+/-	-/+	+/-
PaPh4	+	+	+	+	-	-	+
PaPh5	+	+	-/+	+	+	+/-	+
PaPh6	-/+	-	-	+	-	-	-
PaPh7	-	-	+	+	-	-	+
PaPh8	+T	+	-	-	+/-	+/-	+
PaPh9	-	-	+	+	-	-	+
PaPh10	-	-	-	-	-	-	-
PaPh11	-	-	+	+	-	-	+
PaPh12	+	+/-T	+	-/+T	-	-/+	+
PaPh13	-	-	-/+	-/+	-	-	-
PaPh14	+	+	+	+	-	-	+
PaPh15	-/+	+/-T	-	-	-	-	+/-
PaPh16	+	+	+	+	-	-	+
PaPh17	+	+	+	+	-	-	+
PaPh18	-	-/+	-	-	-	-	-
PaPh19	-	+T	-	-	-	-	-
PaPh20	-	-	+/-	-	-	-	+/-
PaPh21	-	-	+	-/+	-	-	+/-
PaPh23	-	-	-	-	-	-	-
PaPh24	+	+	-	+/-	+	+/-	+
PaPh25	+/-	+/-	-	+	+/-	-/+	+
PaPh26	-/+	+	-	-	-	-	-
PaPh27	-	-	+	+	-	-	+
PaPh28	-/+	-	+	+	-	-	+
PaPh29	-/+	-	-	-	-	-	-
PaPh30	-	-	-	-	-	-	-
PaPh31	-	-	-/+	-/+	-	-	-/+
PaPh32	-/+	-/+	+	+	+/-	+/-	+
PaPh33	+	+	-/+	-	+/-	-	+

Figure 8 Efficacité, in vitro, des différents phages et du cocktail de phages sur différentes souches de *Pseudomonas*. (Forti, Roach et al. 2018)

On peut observer que le phage seul (PY02) avec le spectre le plus large a lysé 36 des 58 souches dont 22 des 40 souches italiennes de patients atteints de mucoviscidose. Tandis que le cocktail de phage a lysé 48 des 58 souches dont 30 parmi les 40 souches de patients italiens.

Ce cocktail a ensuite été utilisé dans le cadre de traitements d'infection respiratoire aigu dans des modèles murins. L'évolution de la charge bactérienne ainsi que le taux de survie des souris ont été observés (figure 9).

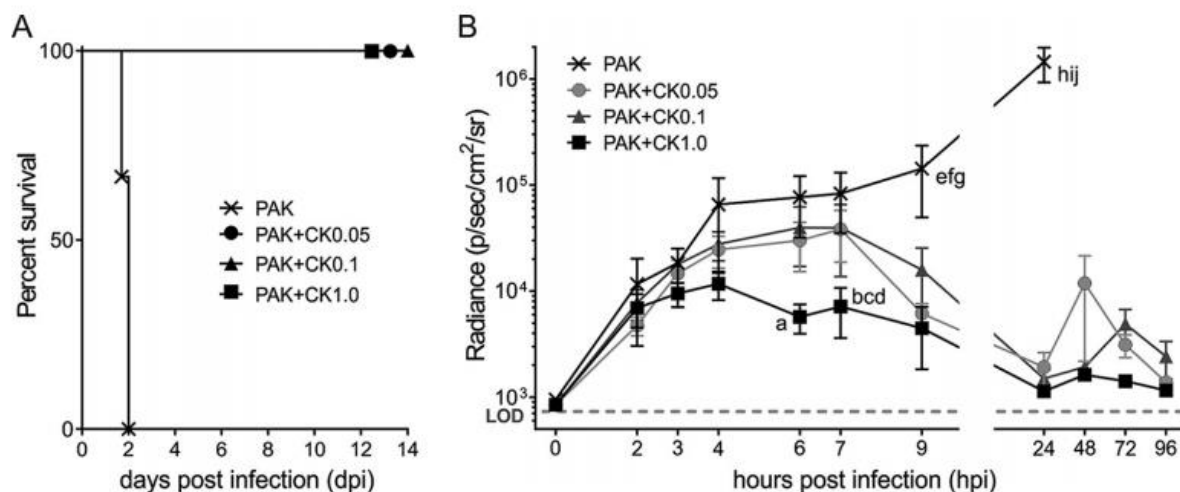


Figure 9 (A) infections respiratoires mortelle après que 1×10^{-7} CFU de la souche PAK- lumi (produisant la luciférase) de *pseudomonas aeruginosa* ($n=5$ souris pour chaque groupe de traitement et $n=3$ pour les souris non traitées) ont été instillées par voie intranasale. Ces infections ont été guéries par l'administration du cocktail de 6 phages (CK) 2 heures après l'infection. (B) Emission de photons de la zone thoracique des souris infectées quantifiée à l'aide d'un système d'imagerie IVIS Spectrum 100 (p/sec/cm²/sr, nombre de photons par seconde par centimètre carré par stéradian).

On peut observer que même à la MOI la plus basse testée (0,05), le cocktail a été efficace dans la réduction de la charge bactérienne à 48h et a permis également un taux de survie de 100 %.

L'administration du cocktail à la plus haute MOI a réduit significativement la charge bactérienne à 6 h alors qu'à une MOI de 0,05 une diminution significative n'est observée qu'après près de 9h de traitement.

En conclusion les chercheurs ont réalisé un cocktail dont les 6 phages ont été, au préalable, sélectionnés selon leurs capacités à couvrir plusieurs souches de *pseudomonas* (le cocktail devait en théorie lyser 97% des souches de *Pseudomonas*).

Ils ont pu mettre en évidence, dans des modèles in vitro, que leur cocktail de phages a permis de lyser plus de souches bactériennes par rapport aux phages uniques.

Enfin, le cocktail a permis de réduire significativement la charge bactérienne dans des modèles in vivo (souris).

6.2.2 Phagothérapie dans le traitement des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

6.2.2.1 Introduction

Lorsque l'infection s'aggrave chez les patients atteints de mucoviscidose, les bactéries forment progressivement des biofilms qui vont réduire drastiquement l'efficacité des antibiotiques. C'est donc une composante importante de la maladie, peut-être la plus difficile à traiter.

A nouveau, quelle alternative apporter à l'antibiothérapie pour pouvoir traiter cette forme de résistance particulièrement complexe ?

A l'heure actuelle il n'existe que peu d'études in vitro testant les phages sur des biofilms de *PsA*.

6.2.2.2 Combinaisons phages-antibiotiques

Dans une étude récemment publiée, Fiscarelli, et al ont testé in vitro l'activité de phages environnementaux isolés contre des isolats de PA provenant de patients atteints de mucoviscidose à l'hôpital pour enfant Bambino Gesù à Rome (Fiscarelli, Rossitto et al. 2021).

Ils ont également testé les phages en combinaison avec des antibiotiques tels que l'amikacine, le méropenem et la tobramycine.

Pour ce faire, 31 isolats de *PsA* ont été sélectionnés pour leur capacité à produire des biofilms dans des microplaques de polystyrène à 96 puits.

Ensuite 5 phages lytiques ont été sélectionnés : F4_ZP1, F9_ZP2, F14_OBG, F17_OBG et F19_OBG.

Résultats : Les auteurs ont évalué la dispersion du biofilm par une méthode spectrophotométrique à l'aide d'une coloration au Crystal violet.

- 1° Phages seuls : Une première expérience compare l'efficacité de l'infection en fonction de la concentration en phage : MOI de 1 versus MOI de 100.

Les résultats des tests, après 4 heures d'exposition, ont révélé que la biomasse du biofilm de *PsA* a diminué de manière significative dans 42 % des cas à la MOI 1 et dans 53,9 % des cas à la MOI 100 (55/102) (tableau 3). Les réductions de la biomasse

des biofilms n'est pas toujours corrélée à la MOI bien que la réduction fût plus importante pour les phages $\Phi 9_ZP2$ et $\Phi 19_OBG$ à un MOI de 100 par rapport à une MOI de 1.

En passant d'une exposition de 4 h à 24H aux phages, on n'observe pas de différences significatives entre les 2 groupes.

Enfin indépendamment du phage et de la MOI utilisée, on observe en général une augmentation de la biomasse du biofilm après 24h (tableau 3), ce qui indique que les bactéries évolueraient, en présence de phages, vers un phénotype résistant aux phages.

Significant PA Biofilm Reduction Numbers (%)				
Phages Tested	4 h		24 h	
	MOI 1	MOI 100	MOI 1	MOI 100 ^a
$\Phi 4_ZP1$	7/18 (38.8)	9/18 (50.0)	10/21 (47.6)	7/21 (33.3) ^a
$\Phi 9_ZP2$	4/15 (26.6) ^b	10/15 (66.6) ^b	6/17 (35.2)	8/17 (47.0)
$\Phi 14_OBG$	6/18 (33.3)	10/19 (52.6)	10/22 (45.4)	15/22 (68.1) ^{a,c}
$\Phi 17_OBG$	14/25 (56.0)	12/26 (46.1)	10/31 (32.2)	10/31 (32.2) ^c
$\Phi 19_OBG$	11/24 (45.8)	14/24 (58.3)	6/24 (25.0)	10/24 (41.6)
Total	42/100 (42.0)	55/102 (53.9)	42/115 (36.5)	50/115 (43.4)

Tableau 3 Biofilms de PA provenant de PAOI et de 33 isolats de *Pa_Ph* de la mucoviscidose (CF) après 4 et 24 heures d'exposition. Nombre et pourcentages (%) de réduction statistiquement significative des biofilms de PA dans les échantillons colorés au cristal-violet. (Fiscarelli, Rossitto et al.2021)

- 2° Combinaisons phages-antibiotiques

Dans cette même étude concernant les biofilms, les 5 phages et les 3 antibiotiques (à des concentrations inférieures aux concentrations minimales inhibitrices) ont ensuite été testés seuls et en association (amikacine, tobramycine, méropénème) contre les différentes souches de *Pseudomonas*.

L'objectif de ces expériences étaient d'observer la supériorité ou non d'une combinaison de phages et d'antibiotiques (en l'occurrence 3 antibiotiques différents) par rapport à l'utilisation de phages seuls pour traiter les biofilms de *PsA*.

Dans le groupe traité uniquement avec les phages on observe une augmentation de la biomasse de biofilms de seulement 5,5% contre 14,8% pour le groupe traité uniquement aux antibiotiques. Les résultats obtenus dans le groupe antibiotique peuvent s'expliquer du fait que les antibiotiques ont du mal à pénétrer les biofilms bactériens pour pouvoir atteindre leur cible.

Discutons maintenant des résultats obtenus avec les différents antibiotiques utilisés lors de ces expériences.

On observe une grande variabilité des résultats selon le type de combinaison et la souche de *Pseudomonas* utilisée. Cela est normal étant donné que la susceptibilité d'une souche bactérienne est différente selon le type de phages et d'antibiotique utilisé.

a) Amikacine

La combinaison phages-AMK a permis de réduire d'avantage la croissance du biofilm par rapport à l'utilisation de phages seuls pour 7 des 18 combinaisons de phages testées (Combinaisons de phages et d'antibiotiques sur différentes souches bactériennes à différentes MOI). On observe donc que la phagothérapie en combinaison avec l'Amikacine permet de réduire d'avantage la croissance du biofilm par rapport aux phages et à l'AMK seul (Annexe 1).

b) Méropénème

L'exposition au méropénème (MPM) seul n'a pas engendré d'augmentation de croissance du biofilm. Ce qui implique donc que les souches bactériennes étaient sensibles au méropénème. Dans 12 puits sur 18, on observe, pour les combinaisons phage-MPM, une réduction plus importante du biofilm comparée à l'utilisation de phages seuls. De plus, la combinaison phage-MPM la plus efficace était l'association à $\Phi 4_ZP1$, qui a réduit la biomasse du biofilm de PA dans 50 % des cas par rapport au MPM seul.

On observe à nouveau une meilleure efficacité dans l'utilisation d'une combinaison de phages et d'antibiotiques par rapport à l'utilisation d'une monothérapie (phagothérapie / antibiothérapie) (Annexe 2).

c) Tobramycine

Dans 9 des 18 combinaisons testées, la combinaison phage-TOB a été plus efficace que lors de l'utilisation des 5 phages seuls, ainsi que 27,7% plus efficace que l'utilisation de Tobramycine seule.

En conclusion, on observe également une efficacité supérieure quant à l'utilisation d'une combinaison ATB-phage par rapport à une monothérapie (Annexe 3).

- 3° Phénotypes du surnageant des cultures de pseudomonas

Après avoir exposé les biofilms de *PsA* aux phages (à une MOI 1 et 100) pendant 24 h, et avant d'ajouter du cristal violet, 100 µL du surnageant ont été prélevés dans un puit pour chaque combinaison Pseudomonas-phage et ont été étalés sur des plaques de gélose MacConkey. Après une incubation à 37 °C pendant 48 h, les chercheurs ont vérifié la présence ou non de phénotype mucoïde.

Le but de cette expérience était d'observer si les phages, comme indiqués plus haut, étaient capable d'induire un switch vers un phénotype mucoïde plus résistant. Les chercheurs ont observé qu'après 48h d'incubation du surnageant sur une plaque de MacConkey des colonies mucoïdes ont été détectées dans 30 combinaisons Phages-bactéries. Le switch au phénotype mucoïde n'était pas corrélé avec l'augmentation de la masse du biofilm ou à la MOI.

En conclusion l'utilisation de phages seuls dans des milieux de cultures bactériennes peut mener à un switch phénotypique vers une mutant bactérien plus résistant.

Ce sont évidemment des observations d'expériences réalisés in vitro. On verra plus tard que la situation in vivo est beaucoup plus complexe (intervention du système immunitaire).

6.2.2.3 Utilisation de cocktails de phages dans le traitement des biofilms de pseudomonas

L'étude de Fiscarelli, Rossitto et al. 2021 se base sur l'utilisation de phages uniques (seuls ou en association avec des antibiotiques).

Forti et ses collègues avaient montré, dans leurs expériences in vitro, la supériorité d'un cocktail de phages dans l'inhibition de la croissance bactérienne par rapport à l'utilisation d'un phage seul.

Penchons-nous alors sur l'étude de Oliveira et al qui étudient l'utilisation de cocktails constitué de 2 phages dans un contexte un peu particuliers (Oliveira, Macedo et al. 2021).

En effet, ils ont étudié l'inhibition, par un cocktail de bactériophages, du biofilm de *PsA* sur la surface du tube endotrachéal.

Pour ce faire ils ont criblé et trié les phages pour ne retenir que ceux présentant la plus forte activité anti-biofilm.

Deux phages ont été sélectionnés pour la réalisation du cocktail sur base, en partie, de leur spectre lytique (le plus large avec les souches multirésistantes) et de leur activité anti-biofilm : vB_PaeM_USP_2 et vB_PaeM_USP_18.

L'activité phagique a été testée sur 3 souches de pseudomonas. On observera au sein de groupes contrôles une croissance similaire entre les souches alors que dans les différents groupes traités aux phages, on observe des différences en fonction des souches bactériennes. Cela indique que l'activité du cocktail est souche dépendante (figure 10,11,12).

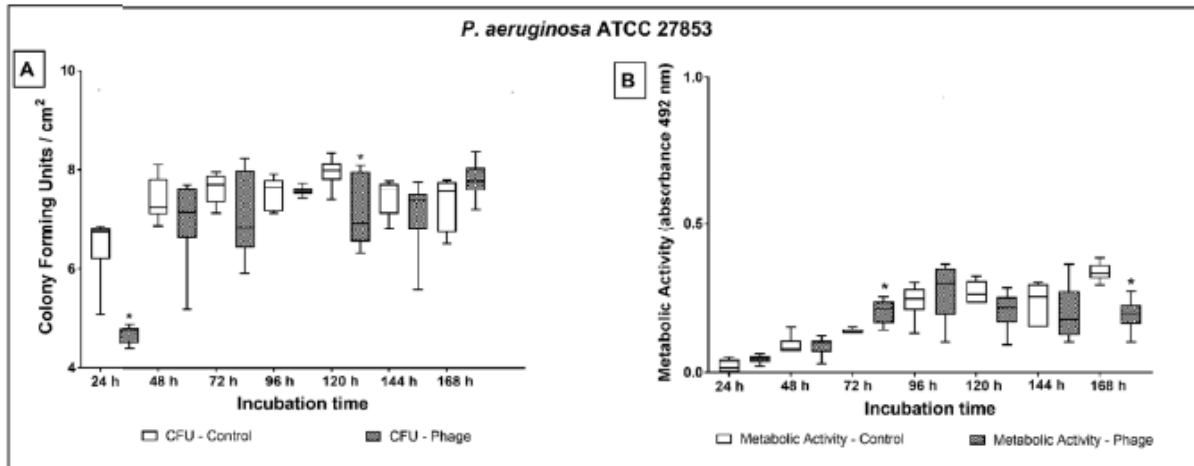


Figure 10 Croissance du biofilm (A) et activité métabolique du biofilm (B) (mesuré par XTT assay : Le test XTT est utilisé pour mesurer l'activité métabolique cellulaire comme indicateur de la viabilité, de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules. Une augmentation du nombre de cellules vivantes entraîne une augmentation de l'activité globale des déshydrogénases mitochondriales dans l'échantillon) de PsA ATCC 27853 sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages. Les comparaisons ont été effectuées entre les groupes, à plusieurs intervalles temps.

Pour la souche ATCC27853, on observe une réduction significative de la charge bactérienne à 24h, tandis qu'à partir de 48h on observe qu'une légère diminution de la croissance du biofilm par rapport au contrôle qui n'est pas significative.

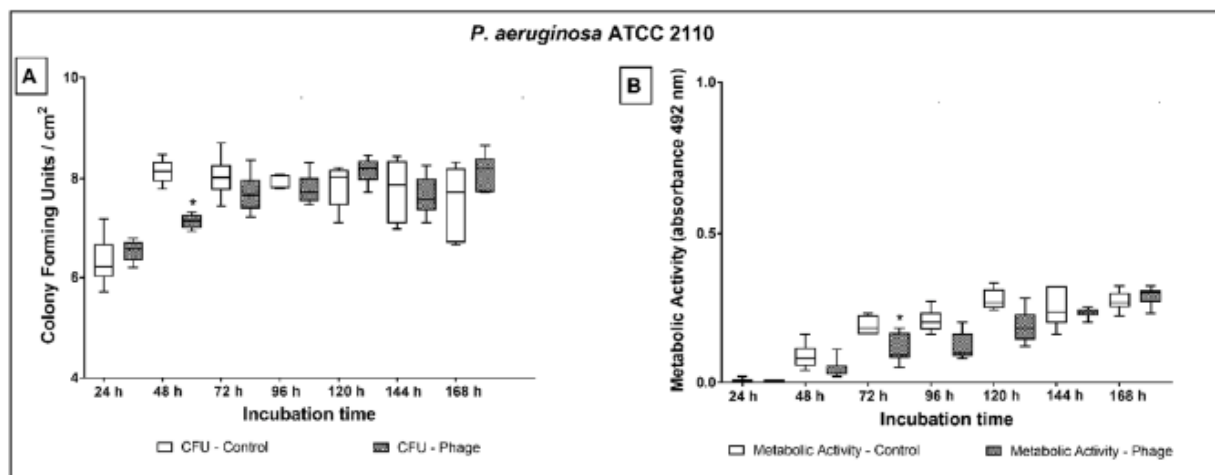


Figure 11 Croissance du biofilm (A) et activité métabolique (B) de PsA ATCC 2110 de 24 à 168 h de croissance dynamique du biofilm sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages. Les comparaisons ont été effectuées entre les groupes, à plusieurs intervalles temps.

Pour la souche ATCC2110 on observe seulement une réduction significative de la charge bactérienne après 48h de traitement par rapport au contrôle.

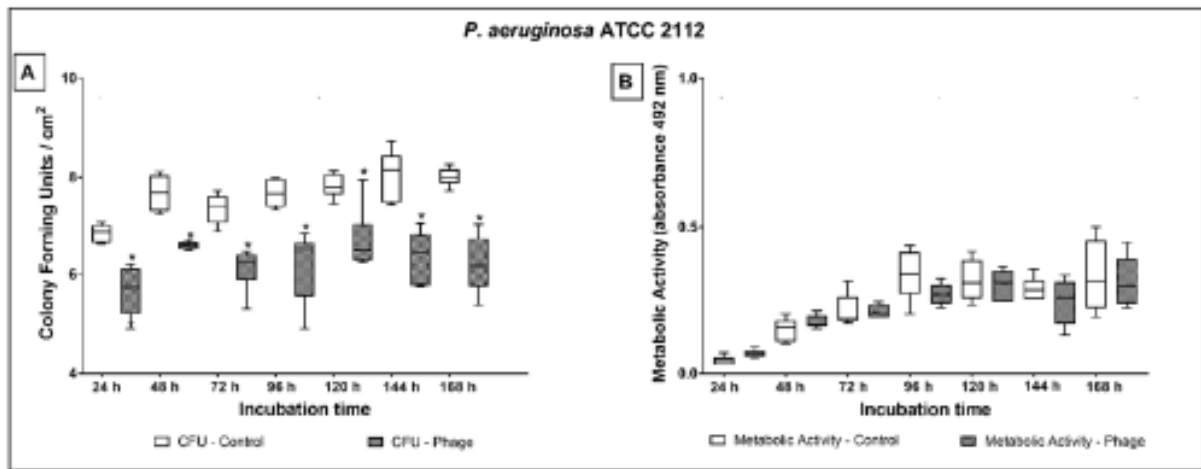


Figure 12 Croissance du biofilm (A) et activité métabolique (B) de PsA ATCC 2112 de 24 à 168 h de croissance dynamique du biofilm sur des tubes non revêtus et revêtus de cocktail de phages. Les comparaisons ont été effectuées entre les groupes, à plusieurs intervalles temps.

Enfin, pour la souche ATCC 2112 on observe une réduction de pseudomonas allant de 1,1 à 1,8 log durant toute la période de traitement.

Comment peut-on expliquer une telle différence avec les deux souches précédentes ? Cela est probablement dû à l'activité métabolique du biofilm de *PsA* plus importante (qui ne diminue pas de manière significative en fonction du groupe contrôle ou du groupe traitement en comparaison des souches ATCC2110 et ATCC 27853).

En effet, comme les phages ont besoin d'hôtes métaboliquement actifs pour se répliquer, le cocktail aurait pu infecter plus efficacement la souche ATCC 2112. Cela est confirmé lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus avec ATCC2110 ou l'on observe à la fois la plus faible activité métabolique et la réduction de la charge bactérienne la moins importante.

Pour corroborer ces résultats, on peut ajouter ceux de l'étude de 2018 de Francesca Forti et al déjà mentionnée plus haut, qui évalué la capacité d'un cocktail composé de 6 phages à pénétrer et réduire la biomasse du biofilm formée par des pseudomonas exprimant une protéine fluorescente. Pour quantifier la réduction du biofilm, Forti et al. ont mesuré la biomasse par coloration au cristal violet des biofilms de 24 heures.

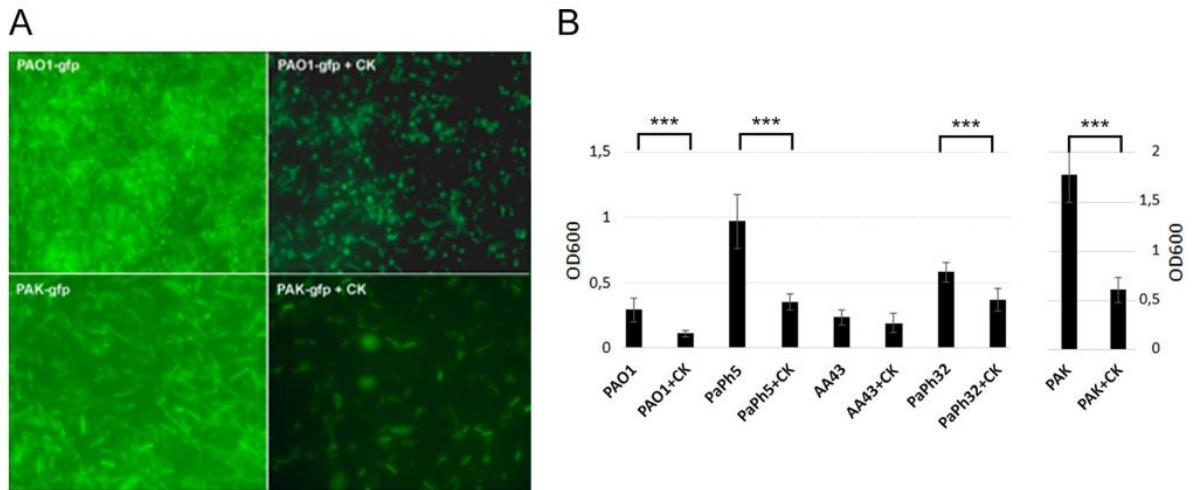


Figure 13 (A) Biofilms à quarante-huit heures de PAO1 *gfp* et de PAK *gfp* sans et après addition du cocktail de phages cocktail de 6 phages (+CK) (B) Des biofilms de vingt-quatre heures des souches de PsA indiquées ont été exposés pendant 4 heures au cocktail de phages. La réduction de la biomasse du biofilm après traitement avec le cocktail de phages a été comparée à celle obtenue sans traitement en mesurant la DO600 après coloration au cristal violet.

On peut observer que la biomasse du biofilm a presque disparu après l'incubation avec le cocktail de phages. Le cocktail a provoqué une réduction significative de la biomasse des biofilms formés par les souches de pseudomonas PAO1 et PAK-lumi (63% et 65% respectivement). Le cocktail a réduit de 64 % (P 0,001) un biofilm très dense produit par la souche PaPh5 utilisée lors de la première infection et a réduit les biomasses de la souche mucoïde AA43 et de la souche mucoïde MDR PaPh32 de 19 % (P 0,6) et 37 % (P 0,001), respectivement. (figure 13).

On observe donc, qu'un cocktail de phage est capable de réduire de manière significative la charge bactérienne d'une colonie de pseudomonas et de réduire les biofilms bactériens provenant de souches très résistantes.

6.2.3 Conclusion et discussion

Feng Chen et al ont testé les effets inhibiteurs de phages HX1 et MYY9 sur les souches cliniques W19 et FRD1 qui étaient destinées à induire des infections pulmonaires aiguës et chroniques respectivement. De façon remarquable ils ont pu mettre en évidence l'effet inhibiteur significatif des phages sur la croissance de W19 et FRD1.

Lors de l'étude de Francesca Forti et al, bien qu'on observe déjà un effet sur la charge bactérienne à l'aide de l'utilisation d'un phage unique, l'application d'un cocktail de phages (à la fois dans les modèles *in vitro* et dans les modèles murins) a paru diminuer encore plus

significativement la charge bactérienne. Bien que ces expériences soient limitées par les modèles utilisés (in vitro + souris) assez éloignés de la pathologie humaine, ces expériences nous permettent de montrer que les phages sont capables de diminuer la charge bactérienne présente dans une culture de pseudomonas.

Ces expériences nous permettent avant tout de confirmer la supériorité, attendue, d'une thérapie polyphage (cocktail) par rapport à une thérapie à phage unique.

En effet l'utilisation polyphage (cocktail de phage), est celle qui est utilisée traditionnellement dans les quelques centres qui pratiquent actuellement la phagothérapie.

Aujourd'hui il n'existe que peu d'études dans le cadre d'étude de l'efficacité des phages contre les biofilms de PsA, et ces études ont été réalisées in vitro. Les résultats obtenus, quels qu'ils soient, ne permettent pas de tirer des conclusions formelles et nécessitent confirmation dans des modèles in vivo.

Lors de l'étude de Fiscarelli et al, nous avons pu observer une hétérogénéité des résultats des différentes combinaisons phages-antibiotiques.

Les chercheurs ont pu mettre en évidence que les phages seuls semblaient incapables de remplacer les antibiotiques dans le traitement des biofilms.

Cependant, certaines associations phages- antibiotiques furent bien plus efficaces dans la réduction de la croissance des biofilms comparées à un traitement antibiotique seul.

C'est notamment le cas de l'association $\Phi 4_ZP1$ -MPM comparé au MPM seul, qui a montré une activité lytique majeure en réduisant significativement deux biofilms cliniques de Pseudomonas de patients atteints de mucoviscidose. Alors qu'à contrario l'association $\Phi 17_OBG$ -AMK était moins efficace que l'AMK seul pour réduire deux biofilms cliniques de pseudomonas.

Enfin, il semblerait, au vu des observations, que les phages appliquent une pression de sélection qui induit le switch des bactéries d'un phénotype WT vers un phénotype mucoïde.

Cette pression de sélection pourrait même être observée in vivo chez des patients atteints d'infections chroniques. Cependant, on verra plus tard que la situation chez l'homme est plus complexe par l'apport du système immunitaire dans la thérapie antiinfectieuse.

Il est donc nécessaire de confirmer les résultats dans de nouvelles études in vivo et de cribler plus de souches (notamment dans l'environnement hospitalier tel que dans les eaux usées) pour pouvoir ainsi déceler des nouvelles combinaisons phages-ATB efficaces contre les biofilms de pseudomonas.

Enfin, au-delà des combinaisons phages antibiotiques, il y a l'activité des phages formulés sous formes de Cocktail.

Lors de l'étude de Oliveira et al, les résultats obtenus ont montré une activité phagique anti-biofilm seulement contre certaines souches bactériennes, en effet au moins 7 souches bactériennes n'ont pas été affectées.

On pourrait expliquer cela de plusieurs manières :

- L'efficacité de l'ensemencement différente entre les souches (au moins 5 souches dont l'ensemencement a été considéré comme faible).
- La période de dosage et de traitement pourrait avoir été insuffisante, il se pourrait que la phagothérapie prenne beaucoup de temps pour pouvoir obtenir des résultats concluants
- Cela pourrait être dû à une mauvaise interprétation des méthodes de coloration et d'imagerie utilisés pour lesquelles les chercheurs ont été très critiques.
- Les mécanismes de résistance des bactéries envers les phages pourraient également influencer les résultats. Toutefois on pourrait tirer profit de ces mécanismes de résistances en associant ces cocktails de phages avec des antibiotiques.

En effet, certaines études ont montré que l'acquisition de résistance envers les phages pouvait augmenter la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. C'est d'ailleurs ce que l'on observe dans l'étude de Fiscarelli et ses collègues. On obtenait de meilleurs résultats lors de l'utilisation concomitante de phages (uniques cette fois ci) et d'antibiotiques.

De plus l'utilisation de phages qui réduisent la masse du biofilm (ainsi que la charge bactérienne), nous permettrait d'utiliser des antibiotiques à moindres doses et ainsi d'éviter une pression de sélection responsable notamment de l'apparition de ces pathogènes multirésistants.

Lors de l'étude de Francesca Forti et al, on observe des résultats encore plus significatifs quant à l'efficacité d'un cocktail composé de 6 phages contre les biofilms de pseudomonas dans des modèles in vitro.

En effet, comme discuté plus haut il y a une évolution constante des phages et des bactéries ou celles-ci vont acquérir des résistances envers les phages qui à leur tour évolueront pour outrepasser ces résistances. L'utilisation de cocktails composés d'au moins 3 phages permettraient de cibler un maximum de souches bactériennes et donc, in fine, être beaucoup plus efficace.

Fiscarelli et ses collègues avaient observés, lors de leurs expériences, que les phages appliquaient une pression de sélection, *in vitro*, qui induisait le switch d'un phénotype bactérien WT vers un phénotype mucoïde. Cependant ces observations n'ont pas été faites dans les expériences menées à l'aide de cocktail de phage ce qui nous pousse, à notre tour, à émettre l'hypothèse qu'une thérapie polyphage n'est pas à même d'induire ce genre de switch phénotypique *in vitro*.

Enfin au vu des résultats observés, *in vitro* et dans les modèles murins, de l'efficacité que ce soit de l'association phage-ATB ou de l'association de phages sous forme de cocktail, on pourrait alors imaginer qu'une association d'une thérapie polyphage couplée à l'antibiothérapie peut nous amener à supposer une potentielle efficacité de cette association contre les biofilms chez l'homme et notamment dans notre cas particuliers d'infections respiratoires à *PsA* multirésistantes chez les patients atteints de mucoviscidose.

6.3 Synergie entre la phagothérapie et le système immunitaire

6.3.1 Introduction

Après avoir discuté de la thérapie monophage, de l'utilisation de cocktail de phages ainsi que de la synergie phages antibiotiques, il nous reste encore une composante thérapeutique importante à discuter qui intervient nécessairement en partie dans la réussite d'une thérapie anti-infectieuse quelle qu'elle soit. Il s'agit bien de l'impact du système immunitaire tant dans la synergie qu'il pourrait y avoir pour éradiquer l'infection bactérienne, mais également dans un contexte de tolérance immunitaire à l'égard des phages, c'est-à-dire à quelle vitesse le système immunitaire élimine les phages administrés aux patients.

On peut donc légitimement se poser la question de l'impact du système immunitaire lors d'une thérapie par phages.

En effet, comme nous l'avons brièvement discuté précédemment, une haute densité en phage peut exercer une pression de sélection en sélectionnant les bactéries résistantes aux phages (tout comme les antibiotiques d'ailleurs).

Cependant, l'immunité pourrait avoir la capacité d'éliminer à son tour les souches bactériennes ayant acquis une résistance face aux phages utilisés. Cela contrasterait avec le paradigme selon lequel la réussite d'une thérapie par phage dépendrait en grande partie de la

sensibilité des bactéries à l'égard des phages. En effet les phages ne sont pas toujours capables d'atteindre toutes les bactéries, même si elles sont sensibles.

Dans une étude parue en 2017, Dwayne R. Roach et al ont étudié les effets de l'immunité de l'hôte sur l'efficacité de la phagothérapie dans le contexte d'une pneumonie aiguë causée par *PsA* MDR (multirésistant) chez la souris et dans des modèles in silico (Roach, Leung et al. 2017) . Et ce en comparant l'efficacité des traitement curatifs et prophylactiques par phages chez des hôtes murins soit sains immunocompétents soit déficients en MyD88, soit déficients en lymphocytes ou alors dépourvu de neutrophiles.

6.3.2 Phagothérapie in vivo chez les souris immunocompétentes.

Pour pouvoir avoir une base de comparaison pour leurs modélisations in silico et leur test in vivo, ils ont tout d'abord étudié l'action du phage PAK_P1 chez des souris immunocompétentes infectées par des souches de *PsA* exprimant le gène de la luciférase (et donc luminescentes en présence de substrat). Une administration de phages à une MOI de 10 a permis, après 2 jours de délais ,100% de survie (figure 14 B). Ils ont ensuite observé le déclin de la prolifération bactérienne par quantification de lumière émise depuis la poitrine des souris (bioluminescence) (figure 14 A).

On constate dans les modèles in vivo, une régression 2 heures après le traitement par les phages et une perte de luinescence après 48 heures. (figure 14 C)

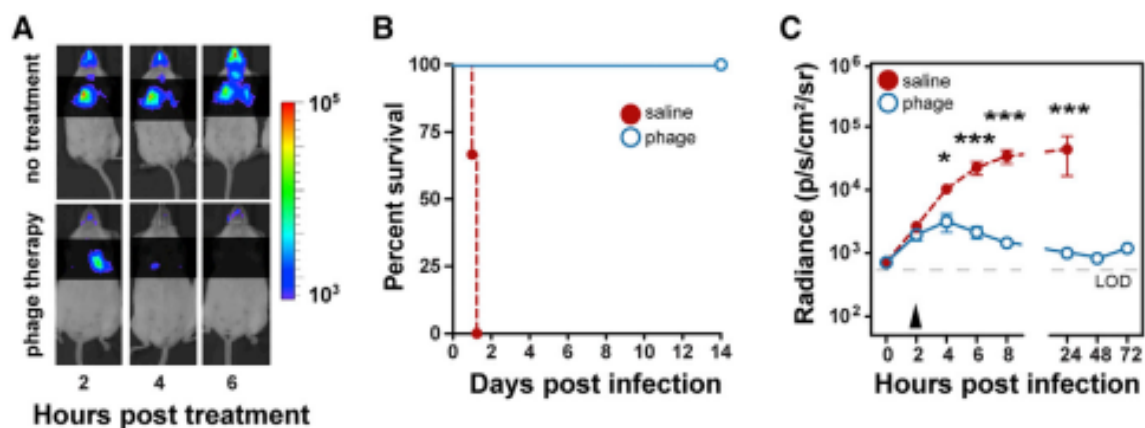


Figure 14 (A) Imagerie in vivo représentative après traitement de souris vivantes infectées par *PsA* ; l'échelle de couleurs représente la radiance (p/s/cm²/sr). (B) Le traitement monophage inhalé à dose unique (MOI de 10) d'une infection respiratoire aiguë mortelle par *PsA* (10^7 UFC) après un délai de 2 heures a permis d'obtenir chez les souris WT immunocompétentes une survie de 100 % par rapport au groupe témoin traité par une solution saline (n = 6 par groupe). (C) Schéma de colonisation de *PsA* bioluminescent dans les poumons de souris vivantes en radiance moyenne au fil du temps, indiquant l'activité antibactérienne du phage par une réduction significative de la charge bactérienne au-delà de 2 heures de post-traitement.

6.3.3 Apport de différentes composantes de l'immunité dans la phagothérapie

Les bactéries invasives, telles que *Pseudomonas*, vont rencontrer les premières lignes de défenses immunitaires de l'organisme que sont, par exemple, les lymphocytes et les neutrophiles.

L'étude de Dwayne R. Roach et al, teste l'importance de l'immunité innée ainsi que l'impact d'une déficience de la signalisation immunitaire dans la phagothérapie.

Elle étudie également l'activation, au lieu de l'infection, du système immunitaire par les phages ainsi que de leur tolérance lors d'une thérapie par phages.

a) Souris déficientes en MyD88

MyD88 est une protéine centrale de transduction du signal pour la plupart des TLR activés par des ligands, provoquant des réponses à la fois innées et adaptative. Par conséquent une déficience pour MyD88 pourrait entraîner une altération des réponses immunitaires innées et adaptatives. Un inoculum de 10^5 CFU de *pseudomonas* a été administré à des souris déficientes pour MyD88. Le traitement par phage, n'a, dans ce cas, augmenté la survie que de 15% par rapport au contrôle. On observe bien une diminution de la charge bactérienne jusqu'à des niveaux indétectables à 24h mais la mortalité n'a toutefois pas été prévenue.

Cela s'explique par le fait que 100% des bactéries restantes étaient résistantes aux phages et n'ont pas su être prise en charge efficacement par le système immunitaire (figure 15B), en accord avec une modélisation mathématique proposée par ces auteurs.

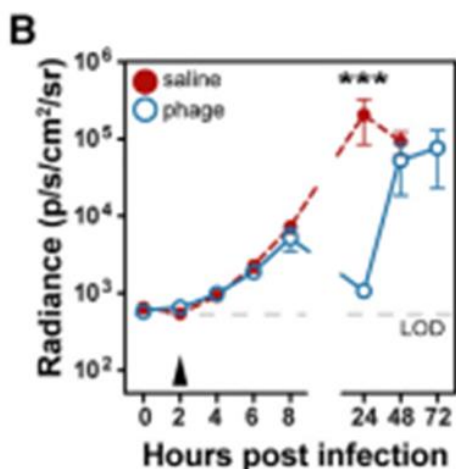


figure 15 Schéma de colonisation de l'agent pathogène bioluminescent dans les poumons de la souris, représenté sous la forme d'une radiance moyenne (p/s/cm²/sr) en fonction du temps pour indiquer l'activité antibactérienne du phage par une brève réduction de la charge bactérienne suivie de la croissance d'un clone résistant aux phages après l'infection

Celle-ci prédit que pour une phagothérapie réussie, il est nécessaire d'avoir une activation immunitaire supérieure à 50 % en cas d'apparition de bactéries résistantes aux phages, et supérieure à 20% même en absence de résistance.

b) Souris déficientes en lymphocytes

Les cellules effectrices de l'immunité innée peuvent être divisées en de nombreux sous-ensembles, mais elles sont généralement classées comme appartenant aux lignées lymphoïdes ou myéloïdes. Les cellules lymphoïdes innées (ILC) - y compris les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules ILC1, ILC2 et ILC3 récemment découvertes, sont concentrées à la surface des muqueuses et exercent des fonctions défensives cruciales (Eberl, Colonna et al. 2015) . Des souris ko empêchant la production d'ILC et lymphocytes T et B (Rag2/Il2rg/) ont été utilisées lors de ces expériences.

Ici, les chercheurs observent qu'une même dose de traitement par phages (10^8 PFU) utilisée pour guérir la pneumonie aiguë chez les souris immunocompétentes a également sauvé plus de 90 % des souris Rag2/Il2rg/ infectées par 10^7 UFC de *PsA* (Figure 16).

Enfin, l'imagerie in vivo a révélé un profil de bioluminescence chez les souris Rag2/Il2rg/ traitées par phages (Figure 16 B) qualitativement similaire à celui des souris des souris WT traitées par phages également (Figure 14 C).

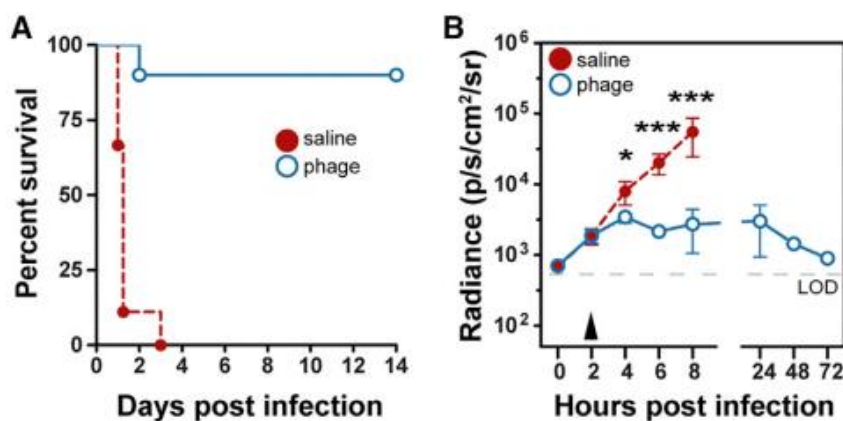


Figure 16 (A) La thérapie monophasage (MOI de 10) après un délai de 2 heures a fourni souris Rag2/Il2rg/ déficientes en lymphocytes une survie de 90 % à une infection respiratoire aiguë par *PsA* (10^7 CFU ; $n = 6$ par groupe). (B) Radiance moyenne des pathogènes bioluminescents (p/s/cm²/sr) dans les poumons de souris vivantes pour indiquer le modèle de colonisation bactérienne et l'activité bactériolytique des phages par une réduction significative de la charge bactérienne au-delà de 2 heures après le traitement.

En conclusion, les résultats obtenus montrent qu'une déficience en cellules lymphocytaires ne semblent pas impacter de façon significative la réussite d'une thérapie par phages.

c) Synergie phages-neutrophiles

Pour étudier l'impact des neutrophiles sur la phagothérapie, des souris dépourvues de neutrophiles ont été utilisées.

Ces souris se sont révélées être très peu sensibles à la thérapie par phages même avec une dose bactérienne diminuée d'un facteur 100.

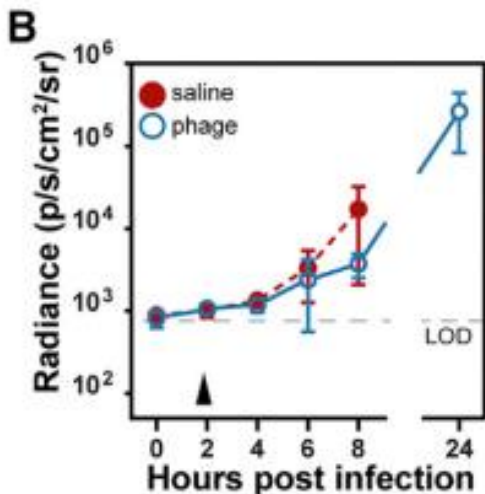


Figure 17 (B) Schéma de colonisation de l'agent pathogène bioluminescent dans les poumons de souris vivantes, représenté par la radiance moyenne en fonction du temps n'a montré aucune indication de l'activité antibactérienne du phage

On ne note pas de décroissance bactérienne en présence de phages, même si les phages ralentissent partiellement la propagation bactérienne (Figure 17 B).

Dans ce cas, les modèles in silico prédisent qu'il faudrait au moins 50% de neutrophiles pulmonaires pour pouvoir avoir une réussite d'une thérapie par phages.

En conclusion, l'action de neutrophiles semble être cruciale pour la réussite d'une thérapie par phages.

d) Absence d'évidence de l'activation directe du système immunitaire par le phage PAK P1

Les études précédentes n'ont pas encore permis de déterminer si les phages eux-mêmes favorisent le recrutement des cellules effectrices du système immunitaire au site de l'infection, ou si la prophylaxie par les phages prépare les cellules immunitaires.

Des expériences ont été réalisées pour mesurer la production de cytokines induite par l'administration d'une dose élevée de phages (10^9 pfu).

L'induction de cytokines en réponse au LPS a été utilisée comme témoin.

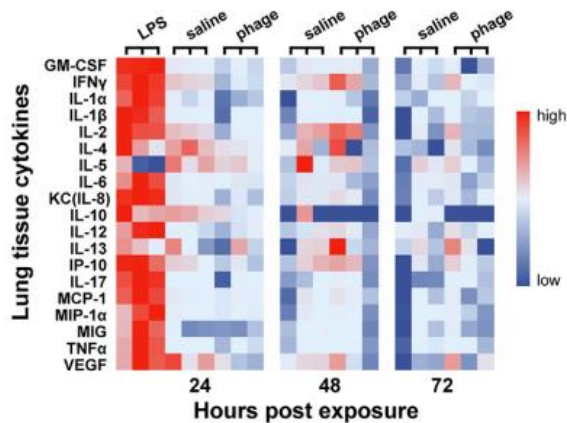


Figure 18 La production différentielle de cytokines (Cytokines mesurées par un test immunologique Luminex multi-analytes à microsphères magnétiques similaire à un test Elisa), dans les tissus pulmonaires de la souris après exposition à 10 mg de *Pseudomonas aeruginosa* LPS, de PBS ou de phages (10^9 PFU).

Les poumons exposés aux phages présentaient des taux de cytokines nettement inférieurs à ceux des poumons exposés aux LPS bactériens. Les phages auraient donc été bien tolérés (figure 18).

Toutefois cette immunotolérance aux phages peut dépendre du type de phage et du contexte. D'ailleurs des études ont prouvé que les phages étaient rapidement éliminés par le système immunitaire (Merril, Biswas et al. 1996) alors que les expériences citées plus hauts ont démontré une certaine immunotolérance bien que les phages aient persisté plus longtemps chez les souris immunodéprimées.

6.3.4 Conclusion

On peut observer lors des expériences réalisées une certaine immunotolérance du phage PAK_P1 chez la souris, cependant il est important de noter que les phages ont été administrés une seule fois chez l'animal et que par conséquent un administration répétée (ce qui est réalisé en pratique lors d'une thérapie par phage) pourraient amener à la longue à une élimination rapide des phages.

Les travaux de Dwayne R. Roach et al permettent de mettre en évidence l'importance du système immunitaire et notamment des neutrophiles pour obtenir une réussite thérapeutique lors d'un traitement par phages.

Par conséquent lors d'un traitement par phages il serait nécessaire de connaître le statut immunitaire du patient pour présager de la réussite ou non de la phagothérapie.

Mais encore, il faudra, chez certains patients immunodéprimés, envisager plutôt une thérapie polyphage ou alors une combinaison de thérapie (aux antibiotiques par exemples) pour espérer une réussite du traitement par phages.

6.4 Voie d'administration

6.4.1 Introduction

Pour que la thérapie par phages soit efficace, il faut que les phages administrés restent viables pendant la production et l'administration le temps d'atteindre le lieu de l'infection.

En effet, la réussite d'une thérapie phagique dans le cadre d'infections respiratoires dépend de la quantité de phages viables qui atteindra les voies respiratoires inférieures.

La nébulisation a déjà été étudiée dans d'anciennes études Européennes pour l'inhalation de liquide de phage (Hoe, Semler et al. 2013).

Il y a relativement peu de rapports sur la thérapie par phages en aérosol chez l'homme.

Cependant, des études de cas ont montré des résultats prometteurs (voir tableau 3)(Hoe, Semler et al. 2013) .

Research group	Year	Content	Respiratory disease treated	Number of patients treated	Recorded results of treatment	Reference
Eliava Institute (Tbilisi, Georgia)	Before 1947	<i>S. aureus</i> phage	Pulmonary <i>S. aureus</i> infection	45 lung operation patients treated with phage and erythromycin	24% re-infected with pleural infection, against 67% in control group (erythromycin only)	Chanishvili ⁽¹⁴⁵⁾
Hoeflmayr	1957–1961	Cocktail of 180–200 phages	Acute and chronic bronchitis	29 patients	55.1% achieved full recovery, 34.8% achieved clinical improvement	Hoeflmayr ⁽²⁰⁾
Meladze et al.	1982	<i>S. aureus</i> phage	Pulmonary <i>S. aureus</i> infection	223 patients (45 received i.v. phage)	82% achieved full recovery, compared with 64% of patients receiving antibiotics (<i>n</i> = 117)	Sulakvelidze ⁽¹⁴⁶⁾
Ioseliani et al.	1980	Cocktail of phages for <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus</i> , and <i>E. coli</i>	Pulmonary <i>S. aureus</i> infection	45 patients	Successfully treated with antibiotics	Sulakvelidze
Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (Wrocław, Poland)	1987–1999	<i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , or <i>E. coli</i> phages	Mucopurulent chronic bronchitis, laryngitis, rhinitis, bronchopneumonia, pleuritis	377 patients	313 (83%) achieved full recovery with no detectable bacteria 51 (13.5%) achieved marked improvement with some detected bacteria	Weber-Dąbrowska et al. ⁽¹⁴⁷⁾

Tableau 4 Études sélectionnées sur la thérapie par bactériophages pour le traitement des maladies respiratoires chez l'homme (Hoe, Semler et al. 2013)

La formulation sous forme de poudres apporte un avantage en termes de stockage, de transport et d'administration avec une meilleure demi-vie.

Vandenheuvel et ses collègues sont parvenus à fabriquer des poudres de phages anti-pseudomonas très stables, séchées par pulvérisation en utilisant comme excipient du tréhalose. Curieusement, le tréhalose n'a pas permis de stabiliser une autre poudre contenant des phages

anti-staphylocoques, ce qui implique que la stabilisation de la formulation est phage-dépendante (Vandenheuvél, Singh et al. 2013).

6.4.2 Excipients

Plusieurs excipients pour la stabilisation, l'aérosolisation et la formulation de phages sont repris dans la littérature scientifique.

Chang et ses collègues ont étudié et exploré divers excipients pour la formulation de phages dans des poudres séchées par pulvérisation (Chang, Wong et al. 2017).

Les excipients utilisés dans les préparations incluaient le tréhalose, le lactose, le mannitol, la glycine, la leucine, l'acide pluronic F68 ainsi que le PEG 3000.

Ces excipients ont tous permis une certaine stabilité dans des formulations liquides.

Le lactose et le tréhalose (utilisé également dans l'étude de Vandenheuvél et al) ont permis une meilleure stabilisation de la formulation comparée aux autres excipients dans des formulations de poudres.

On observe également une bonne stabilisation des poudres de phages avec une association de lactose et de leucine (tableau 4).

Formulation	Sugar (mg/mL)		Leucine (mg/mL)	Pluronic F68 (% v/v)	PEG3000 (mg/mL)	Titre loss (log ₁₀)		
	Trehalose	lactose				PEV1	PEV20	PEV61
F1	0		0	0	0	-8.0 ^a	-8.0 ^a	-8.0 ^a
F2	0		2.8	0.27	5	-8.0	-8.0 ^a	-8.0 ^a
F3	0		5.5	0.54	10	-8.0	-6.7	-8.0
F4	6		0	0.27	10	-2.0	-1.6	-1.3
F5	6		2.8	0.54	0	-1.4	-1.5	-2.0
F6	6		5.5	0	5	-1.8	-1.4	-1.5
F7	12		0	0.54	5	-8.0 ^b	-8.0 ^b	-1.1
F8	12		2.8	0	10	-1.3	-1.4	-1.4
F9	12		5.5	0.27	0	-1.1	-0.5	-0.9
F10		0	0	0	0	-8.0 ^a	-8.0 ^a	-8.0 ^a
F11		0	2.8	0.27	5	-8.0 ^a	-8.0 ^a	-8.0 ^a
F12		0	5.5	0.54	10	-8.0 ^a	-4.0	-8.0 ^a
F13		6	0	0.27	10	-1.5	-1.8	-1.3
F14		6	2.8	0.54	0	-0.8	-0.9	-2.0
F15		6	5.5	0	5	-1.6	-1.6	-1.5
F16		12	0	0.54	5	-1.5	-2.2	-1.1
F17		12	2.8	0	10	-1.3	-8.0	-1.4
F18		12	5.5	0.27	0	-0.5	-0.7	-0.9

Tableau 5 Perte de titre logarithmique des phages PEV1, PEV20 et PEV61 après séchage par pulvérisation en fonction de différentes formulations (Chang, Wong et al. 2017).

D'ailleurs le lactose et le tréhalose sont souvent utilisés comme stabilisateurs de protéines en particulier le tréhalose pour ses propriétés exceptionnelles de stabilisation des phages.

Toutefois, d'autres études contredisent celle de Chang et ses collègues concernant le lactose. L'utilisation du lactose dans les formulations protéiques étaient déjà remise en cause du à ses propriétés réductrices. D'ailleurs, Vandenheuvél et al ont observé une réduction significative

du titre phagique dans des poudres séchées et formulées avec du lactose (Vandenheuvel, Singh et al. 2013).

6.4.3 Conclusion

Lors des deux cas cliniques énoncés précédemment, les phages furent administrés dans des situations d'urgences par voie intraveineuse.

Partant du postulat que pour la réussite d'une phagothérapie il est nécessaire d'obtenir une concentration en phages suffisante atteignant le lieu de l'infection.

La question s'est posée de savoir s'il ne serait pas intéressant, lors d'une infection respiratoire à pseudomonas, d'administrer les phages par aérosol. Cela permettrait d'agir plus localement et d'éviter une perte de phage lors de l'administration et de la formulation de celui-ci.

On a vu que plusieurs études de cas (tableau 3) ont montré des résultats prometteurs en ce qui concernait l'administration de phages par aérosol chez l'homme dans le cadre d'infections respiratoires.

On a également pu relever plusieurs études dont les chercheurs sont parvenus à réaliser des formulations des poudres de phages anti-pseudomonas séchées par pulvérisation très stables. Et ce notamment en utilisant divers excipients dont leur rôle dans la stabilité de ces préparations a été discuté.

Cette voie d'administration nous permettrait donc d'agir beaucoup plus localement et d'éviter une perte importante de phages.

Elle nous permet en plus de cela une administration plus simplifiée chez le patient par rapport à une voie parentérale ainsi que des avantages en termes de stockage, de transport mais surtout de demi-vie.

En effet, comme observé lors des deux cas cliniques, une thérapie par phages nécessite plusieurs administrations sur une période étendue, ce qui est donc moins appréciable auprès du patient qui observerait une meilleure prise en charge à l'aide d'une administration facilitée par aérosol.

Cependant, il faut prendre la clinique du patient dans sa globalité.

Un patient atteint de mucoviscidose qui fait face à une infection respiratoire aiguë à pseudomonas pourrait voir sa fonction respiratoire diminuée et donc observer une difficulté lors de l'inhalation de poudre séchées de phages. On pourrait alors envisager une administration à l'aide d'une chambre d'inhalation, ce qui est utilisée lors de l'administration

de principes actifs vasodilatateurs chez les enfants asthmatiques ne parvenant pas à synchroniser leur respiration avec un aérosol doseur.

7 Etudes cliniques chez l'homme

7.1 Etudes en cours chez des patients atteints de mucoviscidose

A l'heure actuelle, il y a deux études de phase 1/2 qui sont en cours dans le cadre d'infections respiratoires à pseudomonas chez des patients atteints de mucoviscidose, dont les résultats devraient parvenir courant 2022. Ces études pourraient se révéler être un tournant pour les patients atteints de cette pathologie mais également dans le domaine de la thérapie antiinfectieuse.

La première étude américaine financée par Armata Pharmaceuticals vise à évaluer l'AP-PA02 (un cocktail de phages) inhalé chez des adultes atteints de mucoviscidose et de pseudomonas aeruginosa chronique.

C'est une étude de phase 1/2, interventionnelle, multicentrique, en double aveugle, randomisée, contrôlée par placebo, à dose unique et à doses multiples croissantes.

Elle vise à évaluer la sécurité, la tolérance et le profil de récupération des phages du candidat thérapeutique multi-bactériophage AP-PA02 administré par inhalation chez des sujets atteints de mucoviscidose et d'infection pulmonaire chronique à Pseudomonas aeruginosa (48 patients).

L'étude se compose de deux parties. Les sujets atteints de mucoviscidose et d'une infection pulmonaire à pseudomonas aeruginosa seront recrutés soit dans la partie 1 (cohorte à dose unique croissante), soit dans la partie 2 (cohorte à doses multiples croissantes).

La première partie évaluera des doses uniques d'AP-PA02 à trois niveaux de doses croissantes, administrées par inhalation. La partie 2 évaluera la sécurité et l'efficacité de doses multiples d'AP-PA02 dans chacune des trois cohortes à doses croissantes.

Les sujets des parties 1 et 2 seront suivis pendant environ 4 semaines et feront l'objet d'une évaluation de l'innocuité, de la tolérance, du profil des titres de phage et de l'immunogénicité.

Le comparateur (placebo) est une solution isotonique.

L'outcome primaire :

- L'incidence des effets indésirables liés au traitement (sécurité et tolérance) de doses uniques et multiples d'AP-PA02 administrées par inhalation.

Les outcomes secondaires :

- Explorer la récupération de *Pseudomonas aeruginosa* dans les expectorations après l'administration de doses multiples d'AP-PA02 par inhalation.
- Changement dans les unités de *pseudomonas* formant les colonies par gramme d'expectoration.

Cette étude présente plusieurs points faibles selon moi :

- C'est une étude de phase 2 faite sur un nombre de patients (48) très restreint.
- Ils ont exclu les patients souffrants d'immunodéficience acquise ou primaire alors qu'ils auraient pu faire l'objet d'une analyse en sous-groupe.
- Dans leur critère d'inclusion, ils excluent de ce fait les formes sévères de la maladie (Inclusion des patients ayant une FEV > 60 % ou normal)
- Le comparatif aurait pu être un traitement antibiotique utilisé actuellement au lieu et place de la solution saline
- De plus l'étude ne possède pas de comparateurs sains qui seraient les plus adéquats pour comparer les effets secondaires.
- La durée de l'étude de 4 semaines est assez courte pour évaluer l'efficacité du traitement.

Les premiers résultats sont attendus en mars 2022 (clinicaltrials,2020)

La deuxième étude en cours est une étude américaine réalisée cette fois ci par BiomX.

Il s'agit d'une étude multicentrique randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo (tampon), visant à évaluer l'innocuité et la tolérabilité du BX004-04 (cocktail de phages) des sujets atteints de mucoviscidose (32 participants) et d'infection pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa*.

L'étude est à nouveau divisée en deux parties, une phase à dose unique et multiple et une phase à dose multiple (phase 2). Les sujets des deux phases seront inclus dans un suivi de sécurité durant 6 mois.

A nouveau, le but de l'étude est d'évaluer la sécurité et la tolérance du BX004-A et d'observer si ce traitement permettrait de réduire la charge bactérienne dans les expectorations de sujets atteints de mucoviscidoses.

Outcome primaire :

- Sécurité et tolérabilité (6 mois) : Incidence des effets indésirables liés au traitement après l'administration de doses uniques et multiples de BX004-A par inhalation

Outcome secondaire :

- Charge bactérienne (de pseudomonas) dans les expectorations à différents moments (cadre temporel de 1 mois)
- Modification au niveau de la CFU de pseudomonas par gramme d'expectorations.

Cette étude présente aussi plusieurs points faibles selon moi :

- C'est une étude de phase 2 faite sur un nombre de patients (32) très restreint.
- Ils ont exclu les patients souffrants d'immunodéficience acquise ou primaire alors qu'ils auraient pu faire l'objet d'une analyse en sous-groupe.
- La durée de l'étude de 4 semaines est assez courte pour évaluer l'efficacité du traitement.
- Le comparatif aurait pu être un traitement antibiotique utilisé actuellement au lieu et place de la solution tampon.

Les résultats sont attendus Courant juillet 2022 (Clinicaltrials,2021).

7.2 Etudes cliniques dans la cadre d'infections à pseudomonas.

Certes, pour l'instant les seules études en cours chez l'homme ne sont toujours pas finalisées, toutefois on retrouve des études cliniques qui ont été réalisées contre pseudomonas mais cette fois-ci dans d'autres types de pathologies avec plus ou moins de succès.

Une première étude de phase ½ sortie en 2009 concernant l'utilisation de bactériophages contre pseudomonas mais cette fois dans le cadre de traitement d'otites chronique chez 24 participants. C'est une étude randomisée en double aveugle, versus placebo qui évaluait l'efficacité et la sécurité du nouveau traitement (Wright, Hawkins et al. 2009).

Les résultats obtenus sur cette petite étude ont montré que la phagothérapie était efficace et présentait une sécurité d'usage dans le cadre des otites chroniques.

Une deuxième étude sortie en 2019 concernait l'utilisation de bactériophages contre pseudomonas dans le cadre du traitement d'infections des brûlures (Jault, Leclerc et al. 2019). C'est également une étude randomisée, contrôlée en double aveugle qui évalue l'efficacité et la tolérance d'un cocktail de phages chez des patients (24) atteints de brûlures qui présentent une infection à pseudomonas.

Ils ont obtenu des résultats similaires dans les 2 groupes (phages versus antibiotiques), cependant le groupe traité par phages a pris un temps significativement plus long pour atteindre le même résultat (Le critère d'évaluation principal a été atteint en une médiane de 144 h dans le groupe PP1131 contre une médiane de 47 h dans le groupe de soins standard). Ils ont relevé toutefois certaines limites dans leur étude. Premièrement, les groupes de traitement étaient déséquilibrés malgré la randomisation. Les participants du groupe PP1131 (phages) étaient moins gravement brûlés et plus âgés que ceux du groupe de soins standards. Deuxièmement, la charge bactérienne était également plus élevée dans le groupe PP1131 que dans le groupe de soins standard. De plus ayant utilisé de très faibles concentrations en phages, les auteurs recommandent de réaliser de nouvelles études en utilisant cette fois-ci des concentrations en phages plus élevées.

8 Discussion

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une problématique majeure de santé publique qui pousse la communauté scientifique à la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques. En effet, l'OMS a déclaré que si nous ne faisons rien d'ici 2050, on pourrait atteindre une ère post antibiotique ou la mortalité due à de simples infections pourrait devenir banale. L'un des problèmes principaux de la phagothérapie est qu'il n'y a pas réellement de modèle économique permettant aux industries pharmaceutiques d'y investir. C'est d'ailleurs une des principales raisons qui a poussé à l'arrêt du développement de cette thérapie en faveur de la pénicilline et des antibiotiques en général. Toutefois à la vue des problèmes rencontrés dans la thérapie anti-infectieuse aujourd'hui, les phages redeviennent une piste thérapeutique prometteuse. En effet, lors de ce travail nous avons mis en évidence les problèmes particuliers rencontrés lors d'infections respiratoires à *Pseudomonas* MDR qui, chez les patients atteints de mucoviscidose, représentent 80 % des causes de mortalité.

La phagothérapie n'est pas une science obscure dont nous sommes dénués de connaissance mais bien la thérapie anti-infectieuse qui a été la plus en vogue avant la découverte de la pénicilline.

Nous connaissons aujourd'hui le mécanisme d'infections des phages, leur pharmacologie, leur génétique ainsi que tout un tas d'autres aspects qui fait que ces virions ne font plus l'objet d'une recherche fondamentale importante.

Bien qu'aujourd'hui il existe que peu d'études de phase 2/3 réalisées chez l'homme, c'est une thérapie qui a déjà fait ses preuves et dont l'efficacité n'est plus réellement à prouver.

Pour ce qui nous concerne, la littérature regorge d'études in vitro et sur animal dans le cadre de l'utilisation des phages contre *Pseudomonas* et notamment contre des souches communément retrouvés lors d'infections respiratoires. Il y a que très peu de contradiction entre ces études, dont la plupart ont démontré une certaine efficacité à l'égard de ce pathogène et des biofilms formés par celui-ci.

Bien que les résultats montrent clairement l'apport de la phagothérapie contre ce type d'infection, la pathologie chez l'animal et ce qui est observé in vitro restent assez éloignés de ce qu'on peut observer chez l'homme.

Toutefois, on retrouve 2 études de phases 1/2 dans la littérature qui étudient l'administration de cocktail de phages contre *PsA* dans d'autres types de pathologies en usage topique (otites chroniques et brûlures développés plus haut). Ce sont les premières études développées chez l'homme contre *PsA* qui, de plus, ont montré des résultats plus ou moins concluants.

Cela nous amène à imaginer que les résultats attendus des 2 études cliniques en cours (BiomX et Armata pharmaceuticals) pourraient aller également dans ce sens.

Les 2 études de phase 1/2 en cours pourraient se révéler être un tournant dans la thérapie anti-infectieuse.

En effet, ces études s'attaquent à un problème de santé publique majeure (première cause de mortalité et de morbidité chez les patients atteints de mucoviscidose !!!).

De plus, on observe pour la première fois lors d'une étude clinique, l'administration par aérosol de bactériophage chez l'homme qui renforcerait significativement à la fois la prise en charge thérapeutique ainsi que la compliance du patient.

Si les résultats s'avéraient concluants, cela ouvrirait la voie à plusieurs études de phase 3.

Ces études, grâce à une cohorte plus importante de patients, devraient consolider les résultats obtenus en comparant l'association à l'antibiothérapie (ou à quelconque autres traitements) et l'utilisation de la phagothérapie seule pour pouvoir ainsi aborder les différentes possibilités que cette thérapie nous offre.

Comme explicité précédemment, il est nécessaire d'avoir une vraie politique de santé publique pour entrevoir un modèle économique qui pourrait pousser les industries à investir davantage dans la recherche et la commercialisation de cocktails de phages. Le regain d'attention que connaît la phagothérapie aujourd'hui devrait nous permettre d'aller dans ce sens.

Mais une politique de santé publique ne se limite pas qu'à l'aspect économique, il faut d'avantage insister sur la prévention (telle que des mesures d'hygiène etc...) et la nécessité de dépistage de pseudomonas chez les jeunes pour pouvoir leur offrir un traitement plus précocement.

Enfin, il est également important d'insister sur une politique plus globale de prévention à l'égard de la consommation excessive d'antibiotiques ainsi que sur une politique proactive de diminution de leur utilisation dans l'élevage de bétails et l'agriculture (parmi le principal facteur d'apparition de bactéries de plus en plus résistantes) qui aujourd'hui est responsable de l'utilisation de 50% des antibiotiques vendus sur le marché.

9 Conclusion

En préambule de ce travail, nous sommes partis du constat qu'il y'avait un vide thérapeutique pour traiter les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* MDR chez les patients atteints de mucoviscidose.

L'objectif de ce travail a été de démontrer les potentialités de la phagothérapie dans ce contexte-ci.

Deux cas cliniques dans lesquels deux patients, en situation critique, se sont vu administrés des bactériophages et ont observé une bonne réponse thérapeutique, ont permis de servir de point de départ au développement de ce travail.

La littérature scientifique nous a permis de mettre en exergue les différentes expériences faites in vitro et sur animal permettant de justifier une potentielle efficacité chez l'homme.

Les premières études de Feng Chen et al et de Forti, Roach et al qui utilisent respectivement des phages seules et des cocktail de phages ont montré toutes deux une efficacité contre PsA MDR dans des modèles murins et in vitro.

Cela a permis de montrer l'efficacité des phages mais encore plus lors de leur administration sous formes de cocktail .

Nous avons ensuite relevé la problématique des biofilms. Nous savons que les phages possèdent des enzymes capables de rompre les biofilms et, nous avons relevé dans la littérature plusieurs études qui vont dans ce sens.

L'étude de Fiscarelli et al, dont l'objectif était de tester in vitro des combinaisons phages antibiotiques à l'encontre de biofilms de *PsA*, a montré des résultats très divergents poussant même les chercheurs à émettre l'hypothèse que les phages exerceraient une pression de sélection qui permettait à une souche bactérienne WT de « switcher » vers une nature mucoïde plus virulente. Toutefois, plusieurs associations phage-antibiotique ont su montrer une certaine efficacité à l'égard des biofilms de *PsA* par rapport aux phages/antibiotiques seules.

Les études de Oliveira et al et de Forti et al qui, cette fois ci, ont testé des cocktails de phages sur des modèles in vitro et animaux, ont permis de mettre en exergue l'efficacité des cocktails de phages dans la réduction des biofilms bactériens de pseudomonas.

Nous avons également discuté de l'importance de l'immunité et plus particulièrement des neutrophiles dans la réussite d'une phagothérapie.

Par la suite, nous avons pu mettre en avant l'importance et la possibilité d'utiliser une voie d'administration par aérosol par phage séchés en parcourant différentes études de la littérature montrant la réussite d'une telle administration mais également des différents excipients utilisés pour permettre la stabilité des phages durant la fabrication et l'utilisation de l'aérosol. Enfin, différentes études de phase ½, dont les résultats finaux devraient parvenir courant 2022, sont en cours chez l'homme.

Ces résultats devraient probablement suivre la tendance observée lors des premières études de phase ½ réalisées dans le cadre d'infections à pseudomonas (usage topique de bactériophages).

10 Méthodologie

La Microbiologie est un domaine de recherche qui m'intéressait particulièrement. J'ai alors pensé à aborder dans mon mémoire la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Une revue médicale Suisse paru en 2005 relatait le problème des infections chroniques à *PsA* multirésistantes chez les personnes atteintes de mucoviscidose.

Premièrement, j'ai tenté de comprendre les différents mécanismes de virulence de ce pathogène qui rendait ces patients si sensibles à ce type d'infection.

Deuxièmement, j'ai parcouru les différentes alternatives thérapeutiques qui étaient à l'étude chez ces patients. L'article de Pang et al m'a permis de passer en revue les différentes alternatives qui sont à l'étude aujourd'hui .

Parmi celles-ci , la phagothérapie a retenu mon attention. Je découvrirai par la même occasion qu'une première étude de phase ½ était en cours chez l'homme (armata pharmaceuticals) .

Troisièmement , j'ai parcouru la littérature scientifique afin de traiter différentes études précliniques réalisées in vitro et in vivo (sur l'animal) , afin de mettre en avant les différents résultats nous permettant d'aller dans le sens de la phagothérapie.

Enfin , j'ai abordé 2 études cliniques en cours chez l'homme. Ces études n'étant pas finalisées, j'ai alors discuté des attentes et des perspectives en mettant en parallèle d'autres études de phase 2 finalisées chez l'homme dans d'autres types d'infections à pseudomonas.

Pour la réalisation de ce travail, la plupart des articles consultés ont été sélectionnés sur Pubmed : J'ai choisi mes articles en veillant à mettre en avant les études les plus récentes et les plus pertinentes, afin de pouvoir argumenter au mieux les différents sujets abordés.

Pour approfondir ma connaissance sur la phagothérapie, j'ai lu quelques revues de la littérature ainsi que d'anciens mémoires traitants de ce sujet afin de mieux aborder ce travail.

Le plus compliqué durant la rédaction de ce mémoire a été de sélectionner les articles les plus pertinents permettant de répondre aux différentes questions de recherche.

En effet, comme nous n'avons toujours pas à disposition les résultats des différentes études cliniques en cours chez l'homme, il a fallu développer le corps principal de ce travail autour d'études précliniques permettant de justifier ou non l'usage de la phagothérapie.

Tout en sachant que ces études précliniques, bien que présentant des résultats positifs, ne présagent pas forcément d'une réussite de la thérapie chez l'homme.

11 Bibliographie

11.1 Articles

- Brown, S. D., R. White and P. Tobin (2017). "Keep them breathing: Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment." JAAPA **30**(5): 23-27.
- Chan, B. K., S. T. Abedon and C. Loc-Carrillo (2013). "Phage cocktails and the future of phage therapy." Future Microbiol **8**(6): 769-783.
- Chang, R. Y., J. Wong, A. Mathai, S. Morales, E. Kutter, W. Britton, J. Li and H. K. Chan (2017). "Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection." Eur J Pharm Biopharm **121**: 1-13.
- Chanishvili, N. (2012). "Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches." Adv Virus Res **83**: 3-40.
- Chen, F., X. Cheng, J. Li, X. Yuan, X. Huang, M. Lian, W. Li, T. Huang, Y. Xie, J. Liu, P. Gao, X. Wei, Z. Wang and M. Wu (2021). "Novel Lytic Phages Protect Cells and Mice against *Pseudomonas aeruginosa* Infection." J Virol.
- Davies, J. C. (2002). "Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence." Paediatr Respir Rev **3**(2): 128-134.
- Douglas, T. A., S. Brennan, S. Gard, L. Berry, C. Gangell, S. M. Stick, B. S. Clements and P. D. Sly (2009). "Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis." Eur Respir J **33**(2): 305-311.
- Eberl, G., M. Colonna, J. P. Di Santo and A. N. McKenzie (2015). "Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology." Science **348**(6237): aaa6566.
- Fiscarelli, E. V., M. Rossitto, P. Rosati, N. Essa, V. Crocetta, A. Di Giulio, V. Lupetti, G. Di Bonaventura and A. Pompilio (2021). "In Vitro Newly Isolated Environmental Phage Activity against Biofilms Preformed by *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis." Microorganisms **9**(3).
- Forti, F., D. R. Roach, M. Cafora, M. E. Pasini, D. S. Horner, E. V. Fiscarelli, M. Rossitto, L. Cariani, F. Briani, L. Debarbieux and D. Ghisotti (2018). "Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models." Antimicrob Agents Chemother **62**(6).
- Gibson, R. L., J. L. Burns and B. W. Ramsey (2003). "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 918-951.
- Gordillo Altamirano, F. L. and J. J. Barr (2019). "Phage Therapy in the Postantibiotic Era." Clin Microbiol Rev **32**(2).

- Hall, A. R., D. De Vos, V. P. Friman, J. P. Pirnay and A. Buckling (2012). "Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae." *Appl Environ Microbiol* **78**(16): 5646-5652.
- Hoe, S., D. D. Semler, A. D. Goudie, K. H. Lynch, S. Matinkhoo, W. H. Finlay, J. J. Dennis and R. Vehring (2013). "Respirable bacteriophages for the treatment of bacterial lung infections." *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **26**(6): 317-335.
- Jault, P., T. Leclerc, S. Jennes, J. P. Pirnay, Y. A. Que, G. Resch, A. F. Rousseau, F. Ravat, H. Carsin, R. Le Floch, J. V. Schaal, C. Soler, C. Fevre, I. Arnaud, L. Bretaudeau and J. Gabard (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." *Lancet Infect Dis* **19**(1): 35-45.
- Kakasis, A. and G. Panitsa (2019). "Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review." *Int J Antimicrob Agents* **53**(1): 16-21.
- Keen, E. C. (2015). "A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology." *Bioessays* **37**(1): 6-9.
- Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald and L. C. Tsui (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." *Science* **245**(4922): 1073-1080.
- Konstan, M. W., D. R. VanDevanter, S. M. Rowe, M. Wilschanski, E. Kerem, I. Sermet-Gaudelus, E. DiMango, P. Melotti, J. McIntosh, K. De Boeck and A. C. S. Group (2020). "Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF)." *J Cyst Fibros* **19**(4): 595-601.
- Law, N., C. Logan, G. Yung, C. L. Furr, S. M. Lehman, S. Morales, F. Rosas, A. Gaidamaka, I. Bilinsky, P. Grint, R. T. Schooley and S. Aslam (2019). "Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient." *Infection* **47**(4): 665-668.
- Li, Z., M. R. Kosorok, P. M. Farrell, A. Laxova, S. E. West, C. G. Green, J. Collins, M. J. Rock and M. L. Splaingard (2005). "Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis." *JAMA* **293**(5): 581-588.
- Lund-Palau, H., A. R. Turnbull, A. Bush, E. Bardin, L. Cameron, O. Soren, N. Wierre-Gore, E. W. Alton, J. G. Bundy, G. Connett, S. N. Faust, A. Filloux, P. Freemont, A. Jones, V. Khoo, S. Morales, R. Murphy, R. Pabary, A. Simbo, S. Schelenz, Z. Takats, J. Webb, H. D. Williams and J. C. Davies (2016). "Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis:

- pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches." Expert Rev Respir Med **10**(6): 685-697.
- Merrill, C. R., B. Biswas, R. Carlton, N. C. Jensen, G. J. Creed, S. Zullo and S. Adhya (1996). "Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3188-3192.
 - Monteiro, R., D. P. Pires, A. R. Costa and J. Azeredo (2019). "Phage Therapy: Going Temperate?" Trends Microbiol **27**(4): 368-378.
 - Oliveira, V. C., F. L. Bim, R. M. Monteiro, A. P. Macedo, E. S. Santos, C. H. Silva-Lovato, H. F. O. Paranhos, L. D. R. Melo, S. B. Santos and E. Watanabe (2020). "Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tubes." Front Microbiol **11**: 580779.
 - Oliveira, V. C., A. P. Macedo, L. D. R. Melo, S. B. Santos, P. R. S. Hermann, C. H. Silva-Lovato, H. F. O. Paranhos, D. Andrade and E. Watanabe (2021). "Bacteriophage Cocktail-Mediated Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tube Surface." Antibiotics (Basel) **10**(1).
 - Pang, Z., R. Raudonis, B. R. Glick, T. J. Lin and Z. Cheng (2019). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies." Biotechnol Adv **37**(1): 177-192.
 - Pirnay, J. P., D. De Vos, G. Verbeken, M. Merabishvili, N. Chanishvili, M. Vanechoutte, M. Zizi, G. Laire, R. Lavigne, I. Huys, G. Van den Mooter, A. Buckling, L. Debarbieux, F. Pouillot, J. Azeredo, E. Kutter, A. Dublanchet, A. Gorski and R. Adamia (2011). "The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure?" Pharm Res **28**(4): 934-937.
 - Rafeeq, M. M. and H. A. S. Murad (2017). "Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches." J Transl Med **15**(1): 84.
 - Roach, D. R., C. Y. Leung, M. Henry, E. Morello, D. Singh, J. P. Di Santo, J. S. Weitz and L. Debarbieux (2017). "Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen." Cell Host Microbe **22**(1): 38-47 e34
 - Scotet, V., C. L'Hostis and C. Ferec (2020). "The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery." Genes (Basel) **11**(6).
 - Tacconelli, E., E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outtersson, J. Patel, M. Cavalieri, E. M. Cox, C. R. Houchens, M. L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini and W. H. O. P. P. L. W. Group (2018). "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis." Lancet Infect Dis **18**(3): 318-327.

- Thi, M. T. T., D. Wibowo and B. H. A. Rehm (2020). "Pseudomonas aeruginosa Biofilms." Int J Mol Sci **21**(22).
- Vaitekenas, A., A. S. Tai, J. P. Ramsay, S. M. Stick and A. Kicic (2021). "Pseudomonas aeruginosa Resistance to Bacteriophages and Its Prevention by Strategic Therapeutic Cocktail Formulation." Antibiotics (Basel) **10**(2).
- Vandenneuvel, D., A. Singh, K. Vandersteegen, J. Klumpp, R. Lavigne and G. Van den Mooter (2013). "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections." Eur J Pharm Biopharm **84**(3): 578-582.
- Wright, A., C. H. Hawkins, E. E. Anggard and D. R. Harper (2009). "A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy." Clin Otolaryngol **34**(4): 349-357.

11.2 Sites internet consultés

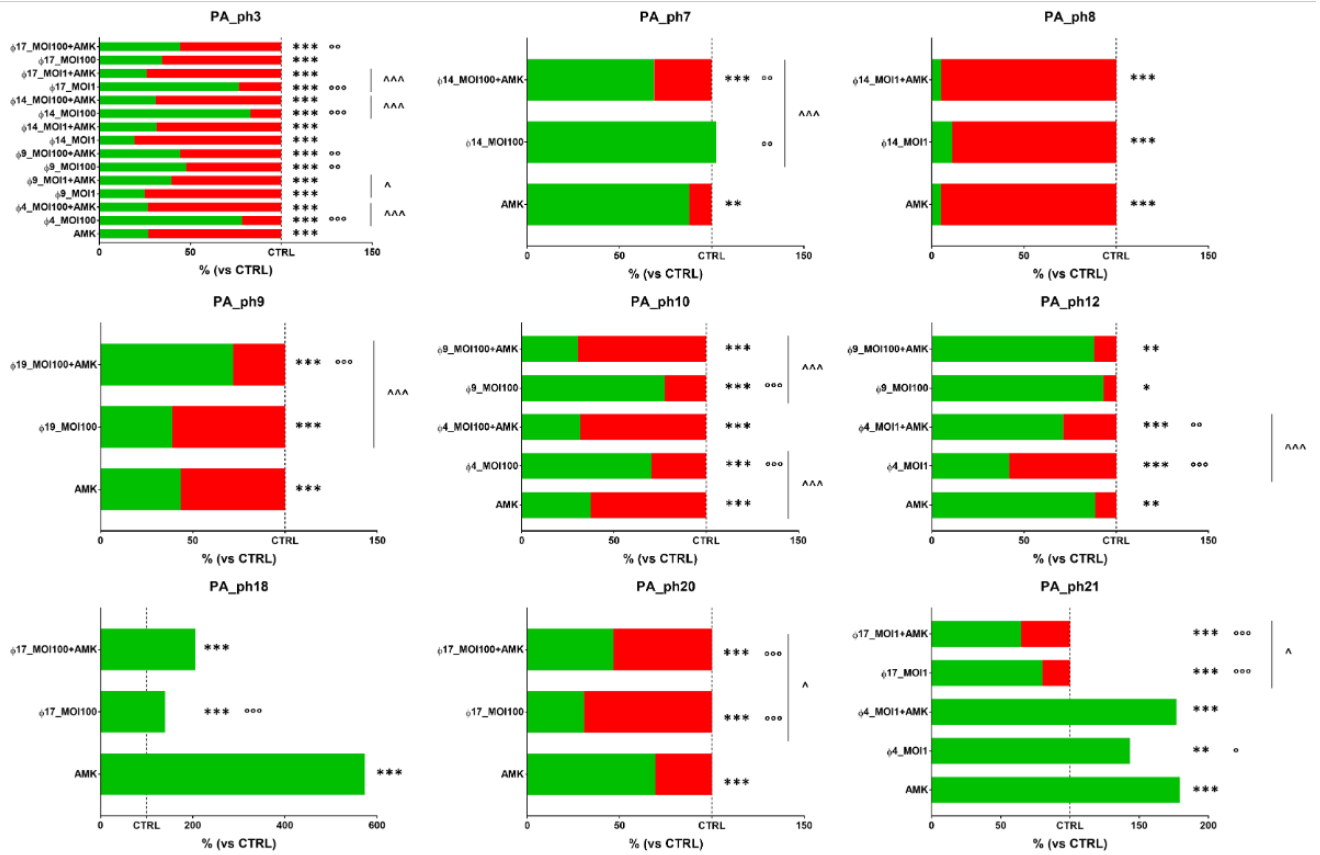
Clinicaltrials 2020 : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04596319> (consulté le 20 décembre 2021)

Clinicaltrials 2021 : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05010577> (consulté le 20 décembre 2021)

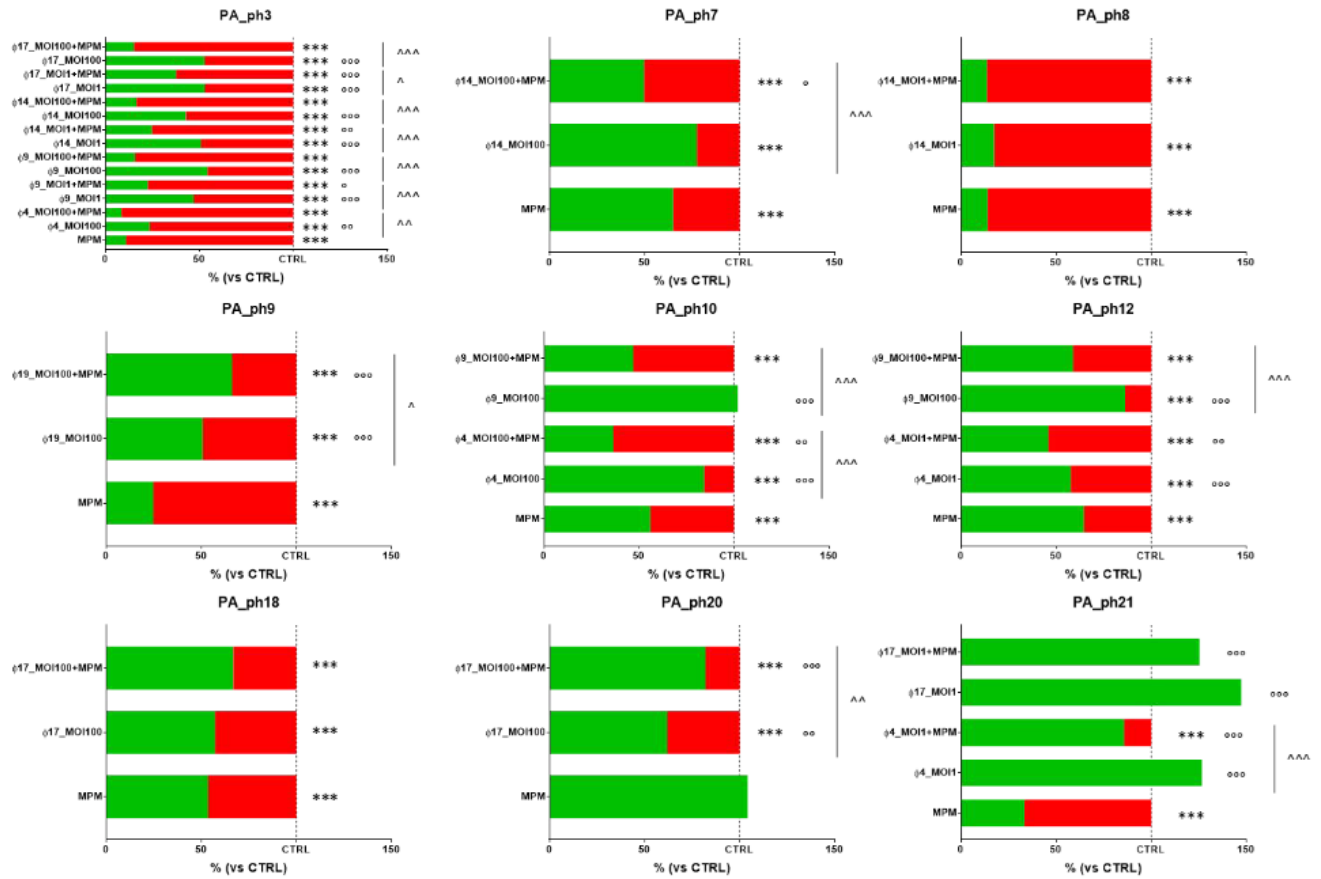
researchgate.net (page consultée le 20 juillet 2021)

Richard H Simon, MD: Cystic fibrosis: Antibiotic therapy for chronic pulmonary infection, 2021 (page consulté le 29 Septembre 2021)

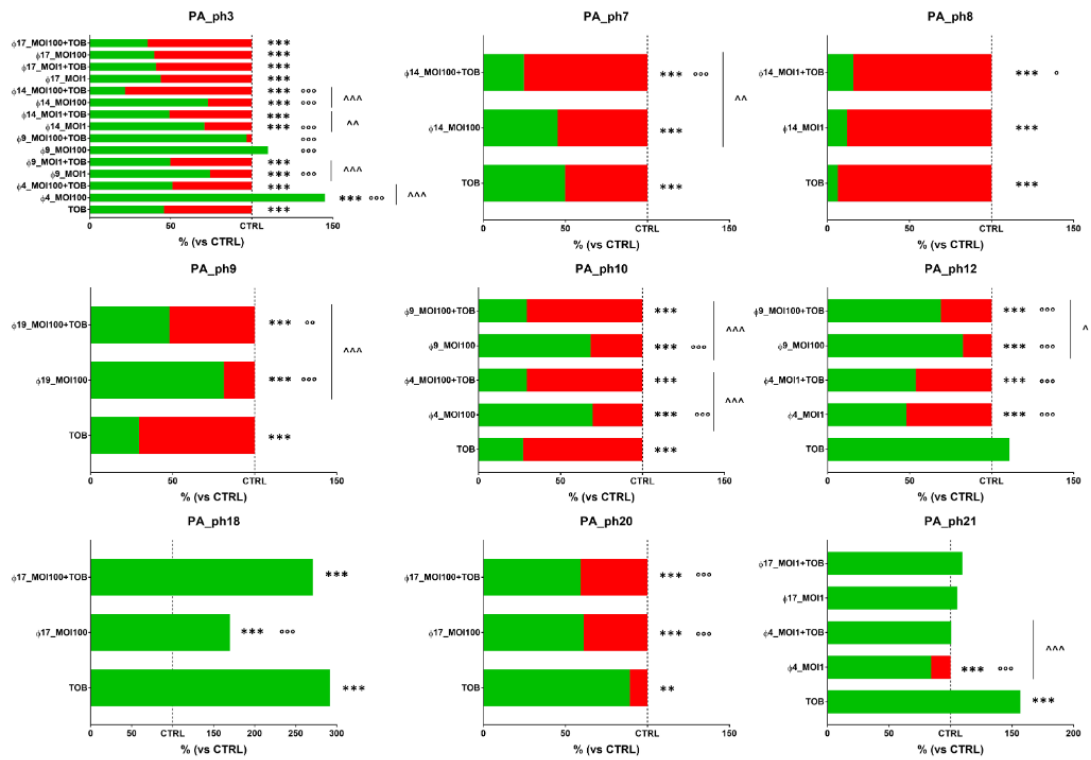
12 Annexes



Annexe 1 Activité *in vitro* des phages et de l'amikacine, seul ou en combinaison, contre 24h de biofilms de *Pseudomonas* de mucoviscidose.



Annexe 2 Activité in vitro des phages et du meropénème, seul ou en combinaison, contre 24h de biofilms de pseudomonas de mucoviscidose.



Annexe 3 Activité *in vitro* des phages et de la Tombramycine, seul ou en combinaison, contre 24h de biofilms de *Pseudomonas de mucoviscidose*.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est aujourd'hui un problème de santé publique majeur. En effet, on observe de plus en plus de pathogènes multirésistants, ce qui nécessite d'avoir recours aux dernières alternatives thérapeutiques. Ce problème de résistance se pose particulièrement chez les patients atteints de mucoviscidose.

La mucoviscidose est une des maladies génétiques les plus fréquentes, caractérisée par une mutation du canal chlorure CFTR.

Chez ces patients, dû à la physiopathologie de la maladie (accumulation de mucus au niveau des voies respiratoires inférieures), on observe une récurrence d'infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* responsable de près de 80% de cause de décès.

Plusieurs alternatives thérapeutiques sont à l'étude à l'heure actuelle, dont la phagothérapie qui revient au premier plan dans la recherche en infectiologie.

Dans un premier temps ce mémoire se penchera sur la physiopathologie de la maladie pour comprendre la susceptibilité, chez ces patients, à ce type d'infection.

Ensuite, diverses études précliniques seront discutées afin d'objectiver l'apport futur de la phagothérapie dans la thérapie anti-infectieuse (anti-*Pseudomonas*).

Enfin, ce travail discutera des 2 études cliniques en cours chez l'homme, de leurs attentes ainsi que des perspectives.

Bacterial resistance to antibiotics is a major public health problem today. Indeed, we are seeing more and more multi-resistant pathogens requiring the latest therapeutic alternatives. This problem of resistance is particularly acute in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis is one of the most common genetic diseases, characterized by a mutation of the CFTR chloride channel.

In these patients, due to the pathophysiology of the disease (accumulation of mucus in the lower respiratory tract), a recurrence of respiratory infections with *Pseudomonas Aeruginosa* responsible for nearly 80% of mortality is observed.

Several therapeutic alternatives are currently being studied, including phage therapy which is coming to the forefront of infectious disease research.

Initially, this work will focus on the pathophysiology of the disease to understand the susceptibility of these patients to this type of infection. Then, various preclinical studies will be discussed in order to objectify the future contribution of phagotherapy in anti-infectious therapy (anti-*Pseudomonas*).

Finally, this work will discuss the 2 ongoing clinical studies in humans, their expectations and perspectives.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN

Faculté de pharmacie et des sciences biomédicales

Avenue Mounier, 73 bte B1.73.06, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgique | www.uclouvain.be/fasb