Les applications antibactériennes des bactériophages

Mireille Ansaldi, Pascale Boulanger, Charlotte Brives, Claire Le Hénaff, Laurent Debarbieux, Nicolas Dufour, Rémy Froissart, Sylvain Gandon, Marie-Agnès Petit, Eduardo Rocha, et al.

▶ **To cite this version:**

Mireille Ansaldi, Pascale Boulanger, Charlotte Brives, Claire Le Hénaff, Laurent Debarbieux, et al.. Les applications antibactériennes des bactériophages. Virologie, 2020, 24 (1), pp.23-36. 10.1684/vir.2019.0805 . hal-02530998

HAL Id: hal-02530998
https://hal.science/hal-02530998

Submitted on 26 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Virologie 2020, 24 (1) : 23-36

Les applications antibactériennes des bactériophages

Antibacterial applications of bacteriophages

Mireille Ansaldi[1]
Pascale Boulanger[2]
Charlotte Brives[3]
Laurent Debarbieux[4]
Nicolas Dufour[4,5]
Rémy Froissart[6]
Sylvain Gandon[7]
Claire Le Hénaff[8]
Marie-Agnès Petit[9]
Eduardo Rocha[10]
Clara Torres-Barceló[11]
Le Réseau Bactériophage France[a]

[1] Centre national de la recherche scientifique, Aix-Marseille Université, Institut de microbiologie de la Méditerranée, UMR7283, Laboratoire de chimie bactérienne, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 9, France
[2] Université Paris-Sud, Université, Paris-Saclay, Institut de biologie intégrative de la cellule, UMR 9198 CEA, CNRS, Bât 430, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, France
[3] Université de Bordeaux, Centre national de la recherche scientifique, Sciences Po., Centre Émile-Durkheim, UMR5116, 11 allée Ausone, 33607 Pessac cedex, France
[4] Institut Pasteur, Département de microbiologie, 25-28 rue Dr Roux, 75015 Paris, France
[5] Centre hospitalier René-Dubos, Service de réanimation médico-chirurgicale, 6, avenue de l'Île-de-France, 95300 Pontoise, France

Résumé. Dès 1917, dans l'article où il décrit ses premières observations et propose le nom de bactériophage, Félix d'Hérelle rapporte une première utilisation de ces virus pour traiter des infections bactériennes, donnant ainsi naissance à la phagothérapie. Le développement de cette application a montré qu'il était possible de mettre en place des traitements ciblant spécifiquement les bactéries, tels que ceux basés sur l'utilisation d'antibiotiques. Ces derniers, de par leur très grande efficacité et simplicité d'utilisation, ont provoqué le quasi-abandon de la phagothérapie. Aujourd'hui, un nombre croissant de bactéries pathogènes pour l'homme présente des phénotypes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Les infections causées par ces bactéries imposent l'utilisation de molécules au spectre d'activité toujours plus large et placent certains patients en situation d'impasse thérapeutique. Cet état de fait a relancé les recherches pour permettre le déploiement de la phagothérapie afin de traiter des patients mais aussi des animaux et des plantes. En fait, les domaines d'applications thérapeutiques des bactériophages s'élargissent au fur et à mesure que les agents antibactériens de nature chimique sont remis en cause, voire interdits. Cette revue revient sur les principes fondamentaux des applications thérapeutiques des bactériophages et expose les données récentes dans les domaines pour lesquels une exploitation commerciale est en cours ou sur le point d'émerger.

Mots clés : phagothérapie, médecine, environnement, agriculture, antibiotiques

Abstract. In the 1917 article in which Félix d'Hérelle describes his first observations and proposes the name of bacteriophage, he also reports the first use of these viruses to treat bacterial infections, thus giving birth to phage therapy. Soon after antibiotics supplanted bacteriophages. Today, bacteria resistant to multiple antibiotics become a growing public health issue worldwide. This situation has revived research aiming at developing the antibacterial activity of bacteriophages to treat patients as well as diseases in animals and plants. In fact, the areas of applications of bacteriophages as antibacterial are widening as current solutions of chemical nature are questioned. This review summarizes the basic principles of therapeutic applications of bacteriophages and presents recent data in areas where commercial exploitation is occurring or about to emerge.

Key words: phage therapy, medicine, environment, farming, antibiotics

Correspondance : N. Dufour <nicolas.dufour@ght-novo.fr>

[a]Le Réseau Bactériophage France regroupe des scientifiques, médecins, vétérinaires, pharmaciens et industriels qui étudient les bactériophages. Ce réseau est soutenu par l'Institut des Sciences Biologiques (INSB) et l'Institut Écologie et Environnement (INEE) du CNRS. L'ensemble des auteurs sont membres de ce réseau et le représentent.

doi:10.1684/vir.2019.0805

Pour citer cet article : Ansaldi M, Boulanger P, Brives C, Debarbieux L, Dufour N, Froissart R, Gandon S, Le Hénaff C, Petit MA, Rocha E, Torres-Barceló C. Les applications antibactériennes des bactériophages. *Virologie* 2020; 24(1) : 23-36 doi:10.1684/vir.2019.0805

[6] Centre national de la recherche scientifique, Institut de recherche pour le développement, UMR 5290 « Maladies infectieuses & vecteurs : écologie, génétique évolution et contrôle (Mivegec) », 911 avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France
[7] CEFE, Université de Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Université Paul Valéry Montpellier 3, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France
[8] EA4577 Université Bordeaux - Bordeaux INP, Institut des Sciences de la vigne et du vin (ISVV), 210 chemin de Leysotte, 33140 Villenave-d'Ornon, France
[9] Université Paris-Saclay, Inrae, Agroparitech, Micalis, UMR1319, Bat 442, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France
[10] Institut Pasteur, CNRS, UMR3525, Microbial Evolutionary Genomics, 25-28 rue Dr Roux, 75015 Paris, France
[11] Unité de Recherches de Pathologie Végétale, UR407, Inrae PACA, 67 allée des Chênes CS 60094, Domaine Saint-Maurice, F84143 Montfavet cedex, France

Introduction

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. Ils sont nombreux et forment l'entité biologique la plus abondante sur notre planète. Présents dans tous les environnements colonisés par des bactéries, y compris au sein du corps humain, ils exercent une pression de sélection sur les populations bactériennes et participent donc activement à leurs régulation (quantitativement) et évolution (qualitativement). Cette interaction antagoniste et dynamique est illustrée par la course aux armements que bactéries et bactériophages engagent pour leur survie, les premières par la mise en place de mécanismes de résistances et les seconds par le contournement de ces mécanismes. Ainsi, ces deux populations coévoluent continuellement [1].

Quelle que soit son orientation (agronomique végétale ou animale, médecine humaine), la phagothérapie se définit comme l'utilisation d'un ou de plusieurs bactériophages pour cibler la ou les bactéries qui posent problème. Cependant, l'isolement de bactériophages d'intérêt (capables de lyser une ou plusieurs souches bactériennes données) peut s'avérer difficile malgré leur abondance. En effet, certaines bactéries, parce qu'elles n'expriment pas les récepteurs habituellement ciblés par les bactériophages ou bien parce qu'elles possèdent différents mécanismes capables de bloquer la réplication virale (par exemple les systèmes de restriction-modification ou le système CRISPR-Cas) requièrent des bactériophages très spécifiques, numériquement plus rares [2]. Ainsi, chaque bactériophage est caractérisé par ce que l'on nomme son spectre d'hôte, qui peut être qualifié d'« étroit » (virus très spécifiques, capables par exemple d'infecter un unique sérotype d'une espèce bactérienne), à « large » dans le cas de bactériophages capables d'infecter des souches appartenant à des espèces bactériennes phylogénétiquement proches (virus généralistes, à spectre large, capables par exemple d'infecter des souches d'espèces bactériennes proches telles que *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus epidermidis*). Ce spectre d'hôte est à rapprocher du degré de polymorphisme génétique de l'espèce bactérienne ciblée : il est facile de trouver des bactériophages généralistes (larges spectres) ciblant des souches d'espèce bactériennes présentant un faible degré de variabilité intra-espèce (*S. aureus* par exemple), alors que cette tâche s'avère impossible lorsqu'il s'agit de cibler des souches d'espèces très polymorphes (*Escherichia coli* par exemple). Enfin, comme pour tout agent thérapeutique, l'innocuité, la tolérance et l'efficacité des bactériophages nécessitent d'être démontrées par des études cliniques contrôlées [3]. Ces études, de par les particularités que présentent les bactériophages, telles que

leur capacité à s'auto-amplifier au cours de leur application et leur nature virale, bousculent un ordre établi essentiellement pour des molécules chimiques. Ainsi, le chemin pour réintroduire les bactériophages en médecine humaine ou pour développer d'autres applications n'est pas un long fleuve tranquille [4]. La dynamique des recherches menées dans ce sens ces dernières années et présentée dans cette revue est incontestablement encourageante.

Les principes de la phagothérapie

Afin d'illustrer notre propos, ce paragraphe sera agrémenté d'exemples tirés de la littérature dédiée à l'application en médecine humaine car elle demeure la plus abondante. Comparativement aux antibiotiques et autres agents antibactériens d'origine chimique, les bactériophages présentent une spécificité d'hôte beaucoup plus étroite. Ainsi, la très grande majorité des bactériophages caractérisés sont spécifiques d'une espèce bactérienne et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce. Des exceptions existent, comme le bactériophage P1, capable d'infecter *E. coli* K12 et certaines souches de *Shigella* et *Salmonella* [5], le bactériophage EcS1 capable de lyser des souches appartenant à trois espèces bactériennes distinctes : *Shigella* spp., *Salmonella enterica*, *E. coli* [6] ou encore certains bactériophages de *Sphaerotilus natans* capables d'infecter également *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* [7]. Par contre, des bactériophages capables d'infecter à la fois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif n'ont jamais été décrits, probablement à cause de l'organisation membranaire très différente de ces deux familles de bactéries.

Il peut toutefois exister un biais dans les données relatives aux spectres d'hôtes des bactériophages. En effet, les données disponibles concernant le spectre d'hôte de chaque bactériophage isolé reflètent d'autant plus la réalité que le bactériophage aura été testé sur un nombre conséquent de souches qui présentent des génotypes différents, représentatifs au mieux de l'espèce bactérienne ciblée (nécessité de collections de souches larges et multicentriques). De façon corollaire, comme précisé plus haut, la variation génotypique existant au sein d'une espèce bactérienne est également une donnée importante : le nombre théorique de bactériophages requis pour couvrir l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne faiblement diversifiée sera plus faible que s'il s'agit de couvrir celles d'une espèce présentant un polymorphisme génétique important. Par exemple, les souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) présentent une faible diversité génotypique, ce qui permet l'utilisation d'un faible nombre de bactériophage pour traiter des infections causées par ce germe [8].

Par contre, pour des infections provoquées par exemple par *E. coli*, la diversité intra-espèce est très importante et finalement peu de bactériophages pourront couvrir plusieurs souches pathogènes [9]. L'utilisation de bactériophages à spectre étroit pourrait aussi limiter les risques d'affecter des souches commensales de la même espèce bactérienne, comme *E. coli* par exemple. La structure réceptrice ciblée par le bactériophage lors de sa fixation à la bactérie et le caractère conservé/essentiel ou bien très variable de cette structure au sein de l'espèce bactérienne est certainement l'un des paramètres majeurs expliquant cette spécificité [10]. Notons enfin que l'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un panel de bactériophages d'intérêt thérapeutique (phagogramme) est réalisée *in vitro* et qu'une transposition directe du résultat obtenu (sensible ou résistant) n'est pas systématiquement extrapolable au sein du site infectieux *in vivo*, du fait des mêmes limites que celles observées avec les antibiotiques (pharmacocinétique, diffusion/concentration sur le lieu de l'infection, discordance entre test sur milieu liquide et milieu solide, etc.).

Dans l'approche thérapeutique humaine, l'utilisation d'une association de plusieurs bactériophages différents semble la plus rationnelle. Cette association en cocktail est justifiée par deux raisons :

– augmenter le spectre global de couverture du mélange en sommant les spectres individuels de bactériophages ciblant différents récepteurs bactériens ;

– minimiser la probabilité d'apparition d'une souche résistante au cocktail : il est en effet plus difficile pour une souche de résister simultanément à plusieurs assaillants qu'à un seul.

Ce dernier point impose néanmoins que les bactériophages du cocktail possèdent des spectres d'hôtes redondants (la bactérie est ciblée par plusieurs phages différents), les mécanismes d'infection des bactériophages ne soient pas antagonistes (récepteurs bactériens différents) et le mécanisme de résistance bactérienne à l'un des bactériophages ne bloque pas l'action d'autres bactériophages [11]. Enfin, il convient de s'assurer que les bactériophages ne se neutralisent pas les uns les autres lorsqu'ils sont assemblés en cocktails [12].

Si l'utilisation de cocktails repose sur des principes simples, leurs mises en œuvre pour traiter des patients sont quant à elles envisagées de deux manières différentes : une approche sur-mesure (personnalisée) ou prêt-à-porter (pour le plus grand nombre) [13].

Dans l'approche sur-mesure, il s'agit d'apporter le ou les bactériophages les plus actifs sur l'agent étiologique qui doit, par définition, être connu et isolé. La largeur du spectre du ou des bactériophages importe peu dès lors que ceux-ci infectent le pathogène causal. Le caractère personnalisé impose de choisir le ou les meilleurs candidats au sein

d'une collection préétablie (phagothèque), ou du patient lui-même (exploitation de son « phagobiote ») ou encore plus simplement de l'environnement (isolement *de novo*). Cette approche est particulièrement pertinente dans le cadre des infections chroniques et/ou pour lesquelles un délai de prise en charge (nécessaire à l'exécution des tests d'activité bactériophage-bactérie) est possible.

Dans le cas du prêt-à-porter, il s'agit d'administrer un cocktail préétabli, dont le champ d'action a été déterminé au préalable. La conception d'un cocktail est idéalement basée sur des données épidémiologiques (*E. coli* est la bactérie retrouvée dans plus de 90 % des infections urinaires communautaires par exemple) et sur des données phénotypiques (par exemple 80 % des souches rencontrées dans ce type d'infection expriment tel phénotype spécifiquement ciblé par tel phage). Il est constitué de façon à obtenir la couverture la plus large possible des souches statistiquement les plus représentées dans un type d'infection donné. Il s'agit donc d'un cocktail permettant de cibler plusieurs souches bactériennes connues pour être impliquées dans les infections considérées. Toutefois, cette stratégie est susceptible de laisser non couverte une fraction microbiologique épidémiologiquement moins représentée (pari microbiologique, au même titre que celui fait lors d'une antibiothérapie probabiliste).

Ces deux approches ne s'excluent pas l'une de l'autre et sont conceptuellement adaptables à chaque situation clinique. De plus, la réévaluation périodique de la composition de ces cocktails semble nécessaire afin de garantir une activité antibactérienne optimale, afin de s'adapter aux résistances des souches qui apparaîtront inéluctablement et d'accompagner les modifications d'épidémiologie bactérienne [11].

Applications des bactériophages en médecine humaine

Actuellement, la prévalence croissante des infections causées par des bactéries multirésistantes est inquiétante comme le souligne un rapport récent de l'Organisation mondiale de la santé (http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/fr/). Il est ainsi devenu urgent de développer de nouvelles stratégies anti-infectieuses. Si l'utilisation des bactériophages comme agents antibactériens n'est pas une solution universelle, elle est réaliste tant en termes économiques que temporels. À la lumière des connaissances fondamentales obtenues au cours de plus de 100 années de recherche, des approches médicales et scientifiques rigoureuses se mettent aujourd'hui en place pour lever les derniers obstacles à la réintroduction de la phagothérapie en médecine humaine dans les pays ayant oublié ou négligé cette approche thérapeutique.

Bien que les bactériophages aient été les premiers agents spécifiquement antibactériens proposés à partir de 1917 par Félix d'Hérelle [14], le destin thérapeutique des bactériophages s'est heurté à plusieurs erreurs historiques qui leur ont jeté un fort discrédit de manière pourtant fortuite : ainsi, au début du siècle (1920-1940), les bactériophages étaient produits selon des standards différents de ceux d'aujourd'hui avec d'importants problèmes concernant qualité et quantité de produit fini, conduisant à la commercialisation de préparations dont l'efficacité était variable, voire nulle [15]. De plus, les indications retenues à l'époque n'étaient pas toujours fondées (on pouvait par exemple utiliser des préparations de bactériophages réputées traiter certaines infections que l'on sait maintenant causées par le virus herpès [16]. De même, l'utilisation de certaines préparations n'était pas toujours appropriée du fait d'une méconnaissance de l'écologie bactérienne impliquée (ce qui arrive encore également de nos jours avec la prescription d'antibiotiques dans le cadre d'infections non systématiquement bactériennes [17]). Enfin, la forte spécificité des bactériophages est un de leur avantage majeur (respect du microbiote, absence d'acquisition de résistance chez les souches non ciblées) mais constitue en même temps l'un des points les plus contraignants (pour choisir le ou les bactériophages actifs, il demeure nécessaire d'isoler l'agent étiologique, de tester sa sensibilité par un « phagogramme », puis de produire la préparation thérapeutique). Toutes ces étapes rendent la phagothérapie plus contraignante par comparaison à l'administration d'antibiotiques à large spectre. Malgré la découverte de nombreux nouveaux antibiotiques, la production de bactériophages thérapeutiques a perduré jusqu'à la fin des années 1970 en France (*figure 1*) où plusieurs préparations étaient inscrites dans le dictionnaire Vidal.

La phagothérapie consiste en l'application de bactériophages dits « virulents » (*i.e.* ne réalisant qu'un cycle lytique, sans cycle lysogénique, qui est une caractéristique des bactériophages dits « tempérés ») pour le traitement d'une infection bactérienne. Même si aucun obstacle conceptuel ne s'oppose à l'action théorique des bactériophages quel que soit le type d'infection, certaines considérations pratiques en limitent l'applicabilité. Par exemple, les méningites, par l'existence de la barrière hématoencéphalique qui impose déjà une forte majoration des posologies d'antibiotiques, constituent des infections dont la prise en charge thérapeutique par des bactériophages n'apparaît pas prioritaire en termes de balance bénéfice-risque, même si elle s'est révélée expérimentalement efficace chez le rat nouveau-né [18]. Inversement, la capacité des bactériophages à augmenter leur concentration au site infectieux suite à leur réplication aux dépens de

Figure 1. Photographie d'une boîte d'ampoules contenant une solution de bactériophages produite en France par un laboratoire dirigé par F. d'Hérelle. On notera l'inscription qui stipule « Délivré gratuitement pour des expériences de traitement, ne peut faire l'objet de transaction commerciale » laissant supposer que ces ampoules n'étaient pas commercialisées.

l'agent pathogène en fait des alliés particulièrement intéressants dans les infections où les antibiotiques diffusent mal : infections osseuses ou articulaires, matériel prothétique, infections de type abcès, empyèmes, etc. [19-21].

Le caractère aigu ou chronique (cinétique intrinsèque) et la morbidité-mortalité de l'infection sont des paramètres déterminant pour l'application (ou non) de la phagothérapie. Ainsi, dans la plupart des infections chroniques, la bactérie responsable est connue et le pronostic vital des patients n'est généralement pas engagé en termes d'heures ou de jours. Il est alors possible d'adopter une approche personnalisée « sur-mesure » (voir ci-dessus). Inversement, la phagothérapie sur-mesure n'est pas recommandée dans le cas des infections aiguës menaçant le pronostic vital, puisqu'on souhaite un traitement efficace le plus rapidement possible alors que la plupart du temps, la bactérie responsable n'est pas encore identifiée. Par ailleurs, dans la mesure où les bactériophages n'infectent que des cellules bactériennes, la phagothérapie est d'un recours limité pour les bactéries pathogènes ayant un développement exclusivement intracellulaire (par exemple *Coxiella burnetii*, *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., *Tropheryma whipplei*) et/ou à croissance intracellulaire facultative (par exemple *Legionnella pneumophila*, *Bartonella* spp., *Brucella melitensis*, *Helicobacter pylori*).

La modélisation de la pharmacocinétique des bactériophages nécessite de prendre en compte de nombreux paramètres liés à leur cycle viral, tels que la constante d'adsorption des virus sur les bactéries hôtes, le nombre de virions libérés par cycle, le temps de latence, la quantité de bactéries initiales et le ratio bactériophage/bactérie (on parle de multiplicité d'infection). De même, la densité bactérienne minimale pour assurer un amorçage de la multiplication/transmission virale doit être connue : par analogie, on sait que certaines maladies virales humaines introduites dans une zone peu peuplée auront une probabilité d'émergence plus faible que si elles sont introduites dans un environnement urbain, avec comme conséquence une extinction précoce de l'épidémie par défaut de relais. La modélisation se complexifie encore lorsque l'on prend en compte la dynamique de la population bactérienne au cours du temps (les cellules non infectées continuant à se répliquer) ainsi que les phénomènes de résistance aux bactériophages et d'amplification de ceux-ci au cours du traitement [22]. Cette pharmacocinétique si particulière n'est que peu abordée dans les études expérimentales animales, typiquement en raison de sa complexité (détermination des constantes virales *in vivo*, inoculum bactérien, constante d'élimination virale spontanée, etc.). Il s'agit cependant d'une approche fondamentalement importante et qui, faute d'avoir été prise en compte, pourrait expliquer un certain nombre d'échecs antérieurs de la phagothérapie [23]. La modélisation théorique de la pharmacocinétique a ainsi permis de corréler positivement et significativement les résultats prédits avec ce qui est observé *in vitro* [24] mais difficilement *in vivo* [25], prouvant la nécessité de poursuivre les études dans ce domaine.

Chez les mammifères (humains comme animaux), la mise en contact d'un virus avec les tissus (par voies cutanée, orale, respiratoire ou intraveineuse) est à même de provoquer une réaction immunitaire, potentiellement délétère pour l'hôte. Toutefois, de manière singulière, les bactériophages ne semblent pas provoquer d'effet toxique [26]. En effet, ces particules virales sont largement présentes dans divers microbiotes avec lesquels les mammifères sont en interactions permanentes, comme par exemple l'intestin [27, 28].

L'innocuité des bactériophages a ainsi pu être démontrée dans différentes études. Au plan expérimental en premier lieu, des études réalisées *in vivo* (modèle murin) et *ex vivo* (sur cellules dentritiques) ont montré que le bactériophage T4 administré par voie intrapéritonéale (T4 entier ou ses protéines majeures de capside) n'a pas induit la production de cytokines de la phase aiguë. Mis au contact de cellules dendritiques, le bactériophage T4 ne provoque pas la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [29]. Enfin, une activité immunomodulatrice des bactériophages a été proposée mais sa pertinence demande à être vérifiée *in*

vivo [30]. Une étude récente a montré que l'administration par voie pulmonaire de deux coliphages chez des souris infectées ou non par des souches pathogènes d'*E. coli* n'entraînait pas de synthèse significative des cytokines de la phase aiguë de l'inflammation (Il-1b, Il-6, TNFa, KC notamment) par rapport aux souris ayant reçu le solvant ou un traitement antibiotique de référence [31].

Chez l'homme, on peut par exemple mentionner l'Institut Ludwik-Hirszfeld en Pologne qui a suivi des patients ($n = 157$ sur trois ans) présentant différentes infections à germes multirésistants, notamment urinaires, osseuses ou respiratoires, et traités par phagothérapie pendant plusieurs semaines. Un suivi biologique de différents paramètres (numération de la formule sanguine, bilan hépatique, fonction rénale et protéine C réactive) a été réalisé après le début du traitement et comparée à la situation avant traitement. Aucune variation cliniquement pertinente de ces paramètres n'a été observée chez ces patients démontrant l'innocuité des bactériophages dans ces conditions [32]. De manière similaire, aucun des volontaires ($n = 15$) ayant réalisé trois prises orales par jour pendant deux jours du bactériophage T4 ciblant *E. coli* n'a présenté d'effets indésirables, ni d'élévation des marqueurs de cytolyse hépatique ni même développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage T4 lors d'analyses réalisées à la fin de la période d'observation [33]. Notons que cette innocuité des bactériophages ne se limite pas au phage T4, mais a aussi été montré avec d'autres applications, voire par exemple l'ingestion de cocktail commerciaux par voie orale [34].

De nombreux cas de patients traités par phagothérapie ont également été rapportés dans la littérature, non obligatoirement centré sur la question de l'innocuité, mais n'ont pas mis en évidence de problème de tolérance, alors même que l'administration de bactériophages était réalisée par voie intraveineuse [35-40].

Outre leur innocuité, l'administration des bactériophages est à même de générer la formation d'anticorps spécifiques. Historiquement, le bactériophage φX174 (un *microviridae* infectant *E. coli*) a été utilisé à partir des années 1960 chez l'homme, en injection intraveineuse, pendant plus de 30 ans, afin d'induire et de quantifier une réponse immunitaire en dosant la présence d'anticorps spécifiques à ce bactériophage [41-43]. On signalera par ailleurs qu'aucun effet secondaire sérieux n'a été rapporté chez ces patients qui recevaient par voie intraveineuse des doses de 2,109 particules virales (PFU) par kilogramme de poids corporel, générant des concentrations plasmatiques post-injection de l'ordre de 5,107 PFU/mL (trois injections au total, espacées de six semaines, étaient réalisées). Les patients immunocompétents développaient tous un schéma de réponse normale avec synthèse d'immunoglobulines de type IgM puis IgG de forte affinité. Ces anticorps possédaient un pouvoir neutralisant envers le bactériophage φX174. Des résultats similaires ont été observés avec le bactériophage T4 [44]. Cependant, cette production d'anticorps n'est pas toujours synonyme d'inactivation virale puisque les anticorps produits peuvent être non neutralisants, n'entravant pas le pouvoir infectieux du bactériophage [45].

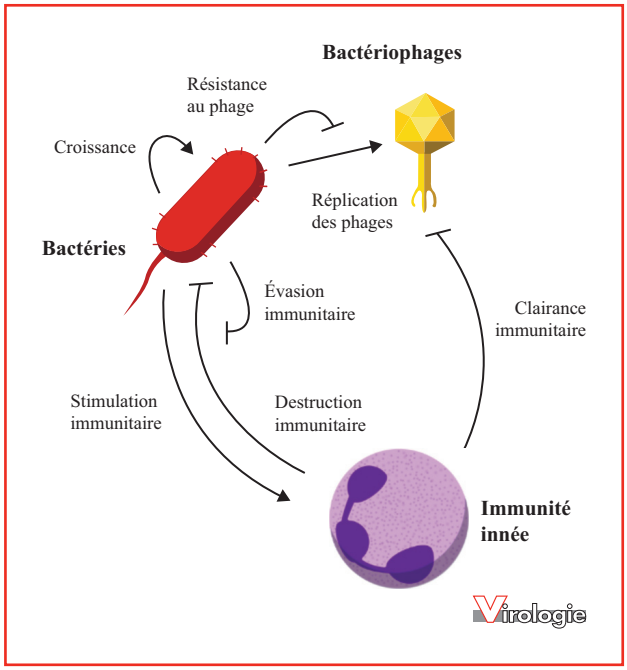

Figure 2. Représentation schématique des interactions multiples entre bactériophages, bactéries et cellules de l'immunité innée prenant place au cours d'une phagothérapie pulmonaire (adapté de [43]).

Enfin, une étude récente permet de poser la question de l'efficacité de la phagothérapie en fonction de l'état immunitaire de l'hôte. C'est pour répondre à cette question que la variation de l'immunocompétence de l'hôte a été étudiée dans un modèle murin d'infection respiratoire [46]. Les auteurs ont pu montrer que les souris immunocompétentes survivent à une infection létale grâce au traitement par un bactériophage, tandis que des souris immunodéprimées ne survivent pas plus qu'en l'absence de traitement par bactériophage. Plus précisément, l'échec de la phagothérapie chez les souris immunodéprimées semble être dû à l'absence de neutrophiles qui limitent, chez les animaux immunocompétents, la croissance des bactéries devenues résistantes au bactériophage utilisé (*figure 2*). Ces travaux montrent bien la synergie entre le système immunitaire et les bactériophages et la nécessité de prendre en considération les interactions tripartites entre bactériophages, bactéries et cellules immunitaires pour contrôler au mieux l'application des traitements.

Lors d'un traitement antibactérien par molécule chimique ou par phagothérapie, les bactéries lysées peuvent induire

une réaction immunitaire aiguë par le relargage d'une quantité importante de molécules immunogènes (endo- et exotoxines, ADN bactérien). Plus précisément, chez les bactéries à Gram positif, il s'agit des acides lipoteichoïques et du peptidoglycane principalement, et chez les bactéries à Gram négatif du lipopolysaccharide (notamment sa fraction lipidique : le lipide A ou endotoxine). Récemment, une étude comparative entre antibiotiques et bactériophages a permis de montrer que le taux d'endotoxine libéré par l'action des bactériophages est bien inférieur à celui obtenu avec des β-lactamines couramment utilisées en clinique [47]. Mieux, les bactériophages et les antibiotiques peuvent être utilisés de manière complémentaire, et ce pour diminuer l'apparition de génotypes bactériens résistants à l'un ou l'autre traitement [48, 49].

Ainsi, quatre situations pratiques peuvent être schématiquement envisageables :

– l'infection est aiguë et sévère, liée à un germe ne posant pas de problème connu d'antibiorésistance où une antibiothérapie conventionnelle est envisageable : dans ce cas la phagothérapie n'est pas pertinente ;

– l'infection est sévère ou non, mais causée par une bactérie multirésistante dont la prise en charge par des antibiotiques de référence est impossible, conduisant à l'utilisation d'antibiotiques moins actifs ou non validés ou présentant des effets secondaires indésirables (*e.g.* insuffisance rénale liée à l'usage de la colistine) : un co-traitement par antibiotiques et bactériophages est pertinent. Dans ce cas, peu de données existent concernant la temporalité optimale d'utilisation de ces deux traitement anti-infectieux (co-administration, antibiotiques puis bactériophages ou l'inverse). Certains auteurs ont ainsi pu démontrer l'importance d'une séquentialité (phages puis antibiotiques) dans le contrôle bactérien et l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques [50]. Par ailleurs, il existe un nombre croissant de publications qui font état d'un effet synergique fort entre ces deux thérapeutiques, notamment en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (situation fréquente en cas de résistance ou en fin de traitement ou encore de mauvais usage). Par un mécanisme mal élucidé, l'utilisation simultanée d'antibiotique majore le pouvoir lytique des bactériophages avec notamment une augmentation de la quantité de virions libérés [51-54]. D'autres travaux ont également mis en évidence une synergie en termes de diminution de la résistance au virus et à l'antibiotique. Par exemple, au cours d'un traitement compassionnel, Chan *et al.*, ont utilisé un bactériophage anti-pseudomonas dont le récepteur bactérien est une protéine d'efflux impliquée dans l'efflux de certains antibiotiques (et donc leur résistance) [35]. Pour la bactérie, un des mécanismes de résistances au phage est une mutation (ou diminution de l'expression) de ce récepteur-pompe, laquelle va aboutir à une perte de cette fonction d'efflux, restaurant alors une sensibilité à l'antibiotique ;

– l'infection est causée par un germe responsable d'une infection bénigne et chronique pour laquelle le traitement antibiotique n'apparaît pas pertinent, contre indiqué (allergie) ou peu efficace (problème de diffusion, résistance, colonisation chronique) : le traitement peut alors être envisagé exclusivement par la phagothérapie. Il s'agit typiquement des infections cutanées (furonculose, infection du pied chez le patient diabétique, folliculite, impétigo peu étendu par exemple) [37] ou de la sphère ORL (otites chroniques par exemple) [55] ;

– il n'y a pas d'infection mais une situation de colonisation par un pathogène (à même de provoquer secondairement une infection). On peut notamment inclure les colonisations urinaires (à l'origine des cystites chroniques), les colonisations bronchiques (mucoviscidose et dilatation de bronches, en dehors des décompensations), les colonisations à germes multirésistants (digestives avec les entérobactéries ou cutanéomuqueuses avec les souches de *S. aureus* résistant à la méticilline), ou encore les colonisations oropharyngées des patients sous ventilation mécanique. Le propos d'une phagothérapie est ici de cibler le réservoir bactérien, de réaliser une épargne antibiotique et d'exercer une action essentiellement prophylactique.

À ce jour, le nombre de cas individuels traités avec succès par bactériophages augmente rapidement dans le monde [35, 38, 40], mais peu d'études cliniques conduites selon la méthodologie de référence (étude en double insu, randomisée et contrôlée contre placebo ou traitement de référence) ont été publiées [56]. Ce faible nombre d'essais cliniques et la qualité variable des publications rapportant les cas individuels rendent ainsi difficile l'interprétation des résultats et diminuent la robustesse des conclusions. Néanmoins, nous rappellerons brièvement les faits marquants issus des trois essais cliniques les plus récents.

Le premier a concerné l'efficacité thérapeutique des bactériophages dans les otites chroniques à *P. aeruginosa* multirésistant [55] (essai contrôlé, en double insu, contre placebo). Le critère de jugement principal était clinique (évaluation des lésions par le médecin avec un score composite et évaluation par le patient de ses symptômes avec également un autre score). Le critère de jugement secondaire était le compte bactérien. Vingt-quatre patients ont été inclus (les patients présentant une infection à *P. aeruginosa* résistant au cocktail de six bactériophages étaient exclus). Le cocktail était administré localement par voie intra-auriculaire une unique fois à j0 avec un suivi à j7, j21 et j42. Les résultats de l'étude sont positifs sur les critères de jugement principal et secondaire avec cependant un effet antibactérien de faible amplitude (réduction du compte bactérien inférieure à un facteur 10).

La deuxième étude (NCT00937274) a porté sur le traitement des diarrhées du jeune enfant (six à 24 mois) à *E. coli* (souches entérotoxinogènes et entéropathogènes principalement) au Bangladesh. Cet essai randomisé contrôlé monocentrique a comparé une prise en charge thérapeutique par une solution de réhydratation orale (traitement commun) avec traitement oral par cocktail de bactériophages ou bien placebo [57]. Deux cocktails de phages étaient testés : un cocktail de 11 phages de type T4, issu de la recherche Nestlé et un cocktail commercial de la société Microgen. Le critère de jugement principal était la tolérance et l'innocuité du cocktail de phage. Le critère de jugement secondaire était la capacité du cocktail à s'amplifier dans les selles et à diminuer la quantité d'*E. coli* entérotoxinogènes. Le troisième critère de jugement était l'impact des cocktails sur le volume et la fréquence des selles ainsi que le volume d'hydratation nécessaire. Des analyses du microbiote fécal ont également été réalisées.

Cent vingt patients ont été inclus. Aucun effet secondaire attribuable aux cocktails n'a été mise en évidence (évaluation clinique et biologique sur des paramètres rénaux, hépatiques et hématologiques). Les cocktails se sont révélés inefficaces sur le plan clinique (critère de jugement tertiaire). En prenant en compte la quantité de phage administré, il n'a pas été observé d'amplification significative des phages des deux cocktails dans les selles, même chez les patients porteurs de souches d'*E. coli* sensibles aux phages administrés. Aucune diminution significative de la quantité d'*E. coli* entérotoxinogène dans les selles n'a été mise en évidence chez les patients traités par phages. La négativité de cet essai peut *a posteriori* s'expliquer en partie par une prévalence plus faible qu'attendue d'infection à *E. coli* entéropathogène (60 % des 120 patients inclus seulement) et par un titre bactérien faible dans les selles, ne permettant pas de soutenir une réplication virale des bactériophages administrés. D'autre part, seulement 50 % des patients présentaient des souches d'*E. coli* sensibles aux cocktails, avec une corrélation positive entre symptômes (diarrhées) et quantité de germes du genre *Streptococcus* dans les selles (analyse du microbiote fécal) soulevant la question de l'agent causal réel de ces diarrhées [58]. Enfin, l'administration des phages se faisait sans neutralisation du pH gastrique, ce qui a pu conduire à une destruction importante des virus administrés et donc une biodisponibilité très réduite en aval de l'estomac.

L'étude la plus récente (non aveugle, randomisée, contrôlée), dénommée PhagoBurn (NCT02116010), a évalué l'effet de l'application locale d'un cocktail de 12 bactériophages ciblant *P. aeruginosa* (infections monogermes) sur les complications infectieuses des plaies de patients brûlés, comparé à la sulfadiazine argentique (traitement antiseptique local de référence) [12]. Le critère de jugement principal était le délai de réduction de l'inoculum bactérien par une méthode semi-quantitative (écouvillonnage quotidien de la plaie et dénombrement sur milieu gélosé). Vingt-sept patients ont été inclus (13 traités par le cocktail de bactériophages, 14 par la sulfadiazine argentique) au cours d'une période de 13 mois. Cet essai s'est révélé négatif, avec une efficacité significativement moindre du cocktail de bactériophages. Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence chez les patients traités par bactériophages. Une analyse effectuée *a posteriori* a révélé une diminution majeure du titre de bactériophages dans les lots thérapeutiques, aboutissant à une application très réduite du nombre de bactériophages sur les plaies (concentration finale active observée autour de 10^2 PFU/mL comparée à une concentration attendue d'au moins 10^6 PFU/mL). De plus, certaines souches bactériennes isolées des patients présentaient une sensibilité intermédiaire, voire une résistance, au cocktail de bactériophages.

Notons toutefois que d'autres essais cliniques sont en préparation en France, en Europe et aux États-Unis, s'appuyant sur des start-ups (*e.g.* Pherecydes Pharma en France, Vésale Pharma en Belgique, Armata Pharmaceuticals aux États-Unis), ce qui apportera rapidement de nouveaux résultats permettant :

– de mieux définir les indications thérapeutiques ;
– de tenir compte des écueils passés et ne pas négliger les paramètres propres à la pharmacodynamie, pharmacocinétiques et galénique optimale des préparations de bactériophages ;
– de mieux définir la place d'une stratégie « prêt-à-porter » (cocktail de phages générique et fixe) comparée à une stratégie « sur-mesure » (un ou plusieurs phages spécifiquement sélectionnés pour cibler la bactérie causale).

Enfin signalons qu'aux États-Unis, dans l'État de Californie, un centre de référence a été récemment créé (juin 2018), avec pour objectif de centraliser et répondre aux demandes de traitement compassionnels par phagothérapie (*Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics*, IPATH). Cette structure, basée à San Diego et sous la responsabilité de la faculté de médecine, se positionne également comme un acteur-clé visant à promouvoir les échanges entre partenaires industriels et institutionnels, dans un objectif thérapeutique premier.

Les applications des bactériophages dans l'agriculture et l'agroalimentaire

Les bactéries pathogènes sont aussi une menace pour la sécurité alimentaire et donc la santé humaine. Dans l'industrie alimentaire, les élevages d'animaux et l'agriculture, l'interdiction ou la réglementation plus stricte de l'usage d'antibiotiques a provoqué rapidement un

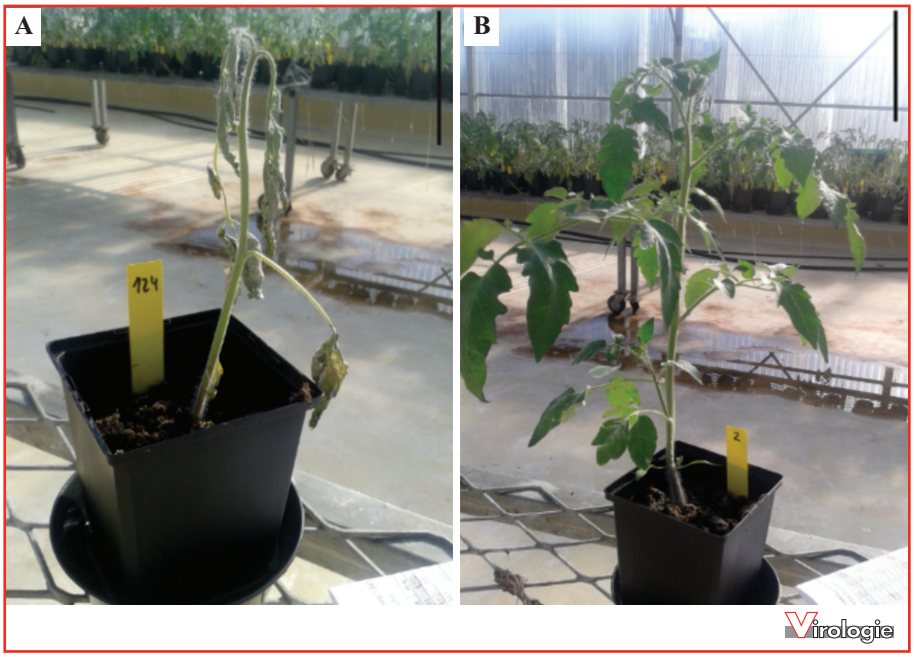

Figure 3. Tests préliminaires de l'action curative d'un traitement par bactériophages ciblant *Ralstonia solanacearum*. A) Plant de tomates flétri sept jours après l'inoculation de *R. solanacearum*. B) Plant de tomates en bonne santé suite à l'inoculation conjointe de *R. solanacearum* et de bactériophages. Expériences menées sous serre au centre de recherche PVBMT à l'île de La Réunion (communication personnelle de C. Torres-Barceló).
La barre d'échelle représente 10 cm.

intérêt vers d'autres solutions antimicrobiennes telles que les bactériophages. Mais l'application des bactériophages dans en agriculture et en agroalimentaire est particulièrement complexe. En effet, ces différents environnements recèlent des substances telles que les matrices des aliments ou les particules du sol, qui peuvent inhiber l'attachement des bactériophages à ses bactéries hôtes. Également, en plein champ, les radiations UV ou le pH extrême de certains sols sont des facteurs limitants, qui cependant peuvent être contournés ou dont l'impact peut être réduit.

Les infections bactériennes chez les plantes entraînent des pertes économiques massives dans le domaine de l'agriculture [59]. La gestion des maladies de plantes comprend majoritairement la sélection de cultivars résistants ou l'utilisation de produits chimiques tels que les métaux lourds ainsi que les antibiotiques dans certains pays. Plusieurs limitations à ces approches existent, y compris l'augmentation des parasites résistants aux deux dernières mesures. De plus, les antibiotiques se répandent dans le sol et l'eau et ont des conséquences majeures en santé humaine et dans l'environnement du fait de la sélection de bactéries multirésistantes [60, 61]. Les stratégies de lutte biologique cherchent à développer des méthodes durables et naturellement intégrées pour résoudre ces problèmes, illustrés par les progrès réalisés dans la lutte biologique contre les insectes nuisibles [62]. En agriculture, le développement de stratégies de lutte biologique a été encouragé par des initiatives telles que le plan EcoPhyto du ministère français de l'Agriculture. En dépit d'un impact majeur sur la production alimentaire mondiale, la gestion durable des maladies bactériennes des plantes est encore très limitée.

Dans le contexte agricole, des préparations de bactériophages contre les bactéries pathogènes de plantes ont été utilisées dès 1924 et représentaient donc des agents de biocontrôle pionniers [63]. Des essais en serre et sur le terrain contre les principaux phytopathogènes tels que *Xanthomonas* spp. (y compris *Xylella* sp.), *Erwinia amylovora*, *Streptomyces scabies* ou *Ralstonia solanacearum* ont été concluants (*figure 3*) [64]. De même, un essai de biocontrôle au vignoble a été rapporté au Texas afin de traiter (de manières curative et prophylactique) le pathogène *Xylella fastidiosa*, responsable de la maladie de Pierce de la vigne [65]. De manière intéressante, plusieurs entreprises se sont lancées dans la production de bactériophages, certaines comme Omnilytics (originaire des États-Unis, mais achetée en 2015 par l'entreprise chinoise Phagelux) depuis plus de 15 ans, avec des produits tels que AgriPhage dont l'objectif est de protéger les cultures de tomates et de poivrons de l'attaque des pathogènes *Xanthomonas pestris* et *Pseudomonas syringae*, à la fois en agriculture conventionnelle et biologique [66]. En 2019, la même entreprise a débuté la commercialisation d'une préparation

de bactériophages contre *E. amylovora*, bactérie responsable du « feu bactérien », l'une des maladies les plus problématiques pour les pommiers et poiriers en Europe actuellement. Les bactériophages dans l'agriculture aux États-Unis ont un statut de GRAS (*generally recognized as safe*), qui simplifie énormément leur réglementation auprès de la *Food and Drug Administration* (FDA). On notera également la commercialisation en Grande-Bretagne par *APS Biocontrol* d'une approche de contrôle post-récolte assurant la protection des pommes de terre ensachées vis-à-vis de bactéries d'altération. Cette entreprise a connu un succès commercial important au Royaume-Uni (plus de 40 % des pommes de terre des supermarchés traités avec bactériophages), et elle est en train de finaliser un produit contre *Pseudomonas* sp. pour traiter des salades emballées et des raisins secs. Il faut noter que les préparations de bactériophages d'*APS Biocontrol* ont été approuvées en tant qu'« auxiliaires technologiques », sans besoin d'étiquetage ou de tests de toxicité, au contraire des produits classifiés en tant que biocides pour une utilisation en plein champ.

Dans les élevages européens, suite au bannissement des antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance, l'intérêt pour les bactériophages se développe. C'est certainement en pisciculture que les essais sont les plus avancés, dans les pays nordiques, pour lutter contre les pathogènes de la truite arc-en-ciel et du saumon, en particulier *Flavobacterium psychrophilum* [67]. CUSTUS®$_{YRS}$ est un produit commercialisé par une entreprise norvégienne récemment approuvé, en tant qu'auxiliaire technologique également, pour contrôler *Yersinia ruckeri*, un pathogène du saumon très problématique en aquaculture. Un très net intérêt est également manifesté dans la filière aviaire, qui repose sur des cocktails contre *Salmonella* ou *Clostridium perfringens* commercialisés en Europe par Intralytix [68]. Certaines infections bovines causées par *S. aureus* ou porcines par *E. coli* sont aussi ciblées par plusieurs entreprises à l'aide de bactériophages. En somme, le potentiel des bactériophages en agriculture semble majeur, car la phagothérapie peut s'appliquer à un large éventail de pathosystèmes, en prévenant les risques émergents de pathogènes associés au changement climatique. De plus, la phagothérapie est hautement complémentaire à d'autres méthodes respectueuses de l'environnement, permettant une gestion intégrée des maladies des plantes ou des animaux. Les défis sur les conditions d'application des bactériophages sont immenses au regard de la variété des situations, rendant prioritaire le renforcement de la recherche sur les conséquences environnementales de l'emploi de bactériophages à grande échelle. En effet, les dynamiques naturelles entre bactériophages et bactéries dans les environnements agricoles sont peu connus par rapport aux milieux marins ou au tube digestif des animaux. Il est maintenant nécessaire d'intégrer les bactériophages dans les études à venir sur le microbiote

Figure 4. Exemples de deux produits commerciaux pour des applications agroalimentaires ciblant *Listeria monocytogenes*.

du sol, des plantes et des eaux pour pallier ce manque de connaissances et mieux évaluer les risques des diverses phagothérapies envisagées.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, les bactériophages complètent l'arsenal des outils de maîtrise de la sécurité des aliments. Ils permettent de limiter le développement des pathogènes pendant les étapes de transformation et/ou sur les surfaces en contact avec les aliments.. L'exemple le plus représentatif est *Listeria monocytogenes*, qui revêt une forte priorité dans les industries alimentaires dans les secteurs des produits laitiers, de la viande et du poisson [69]. Depuis 2007, deux cocktails de bactériophages anti-*Listeria* sont disponibles et bénéficient des agréments conjoints des autorités sanitaires américaines (FDA), canadiennes (*Environmental Protection Agency* [EPA]) et plus tardivement européennes (*European Food Safety Agency* [EFSA]). Ces produits (ListShield™, société Intralytix et PhageGuard Listex ™, société *Micreos Food Safety*, *figure 4*) sont actuellement implémentés par les grands groupes agroalimentaires dans les processus de production et conditionnement des aliments à risques, où ils participent à la maîtrise du risque de contaminations. Ces produits sont utilisés comme auxiliaires technologiques, en complément des bonnes pratiques d'hygiène et de production. En Europe, il n'y a pas encore de position officielle uniforme, mais cependant les ministères de la Santé danois et suisse ont d'ores et déjà rendu un avis officiel autorisant l'utilisation de la préparation ListexP100 comme additif en production alimentaire. Sur le même principe la société Intralytix fabrique également le produit EcoShield autorisé aux États-Unis et au Canada [70] (FDA, 2010), ciblant *E. coli* O157:H7 responsable de colites hémorragiques graves et FINK TEC GmbH (Hamm, Allemagne) développe le produit Secure Shield E1, actif sur

Tableau 1 Synthèse des avantages et inconvénients de l'utilisation thérapeutique des bactériophages.

Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Spectre d'hôte étroit	• Impact nul sur les bactéries non ciblées (microbiote) • Limitation du nombre de souches susceptibles de développer une résistance à un bactériophage donné	• Pour les approches probabilistes, cela implique l'utilisation de cocktails de bactériophages pour augmenter la couverture antibactérienne
Grande diversité	• Probabilité élevée d'isoler un bactériophage infectant une souche pathogène	
Mécanisme d'action	• Activité bactéricide rapide • Activité lytique indépendante de la résistance aux antibiotiques • Activité anti-biofilm de certains bactériophages (capables de dépolymériser les polysaccharides composant les biofilms)	• Comme les antibiotiques, relargage d'endotoxines (et autres) lors de la lyse
Nature virale (virus de bactéries)	• Diffusion prouvée dans un grand nombre de tissus • Incapacité à infecter les cellules eucaryotes • Réplicatif : augmentation de la concentration sur le lieu de l'infection • Présents naturellement dans l'environnement, il n'est pas nécessaire de les fabriquer • Isolement rapide de nouveaux bactériophages possible (en quelques heures ou jours) pour un grand nombre de pathogènes	• Mise en jeu possible d'une immunité humorale avec production d'anticorps neutralisants • Stabilité variable dans le temps, influencée par les conditions de stockage (pH, température, UV…) • Capacité potentielle à induire du transfert horizontal de gènes par transduction généralisée (facteur de virulence, résistance aux antibiotiques)

E. coli. Enfin, il convient de mentionner le dynamisme des travaux en cours sur le contrôle d'autres agents de toxi-infections alimentaires comme les salmonelles, shigelles et l'espèce *Campylobacter jejuni*. Néanmoins, l'interaction phages-bactéries au sein des matrices alimentaires traitées (qui peuvent être d'une complexité physicochimique très variable selon l'aliment considéré) est un paramètre important à prendre en compte : certaines matrices immobilisent les phages après leur introduction, limitant ainsi leur action vis-à-vis du pathogène en cas de re-contamination. Ces points ont notamment été soulignés par l'ANSES lors d'une saisine en 2014 (2013-SA-0111).

Dans les industries agroalimentaires, les travaux s'élargissent aujourd'hui au biocontrôle par les bactériophages des flores indésirables responsables de la production d'amines biogènes [71] ou de déviations organoleptiques au cours des procédés de fermentations. Les bactériophages sont ainsi envisagés afin de réduire les flores productrices d'amines biogènes ou encore les flores d'altération dans les filières laitière et viticole [72-75]. Les avancées récentes dans l'utilisation commerciale des bactériophages en agriculture ou dans l'industrie alimentaire ne se reflètent pas dans les données scientifiques publiées. Des détails sur les préparations de bactériophages déjà commercialisés, les modes d'application ou les résultats acquis sont encore trop peu nombreux et justifient la mise en place d'études supplémentaires.

Conclusion et perspectives

En résumé, l'utilisation des bactériophages à visée thérapeutique présente plus d'avantages que d'inconvénients. Ils sont brièvement résumés dans le *tableau 1*. Pour être utilisé en thérapeutique, un bactériophage devra être défini et « labellisé » en répondant à un cahier des charges précis tel que proposé par certains auteurs [76, 77]. Comme nous l'avons vu, l'utilisation de la phagothérapie en santé humaine ou dans l'agroalimentaire (animale ou végétale) doit suivre des règles strictes afin de garantir toutes les conditions d'efficacité et d'innocuité pour les hôtes (humains, animaux, plantes) mais également leur impact faible ou absent sur l'environnement. Par ailleurs, il est important de considérer que cette thérapie peut être complémentaire aux autres stratégies de luttes antibactériennes actuellement en cours de développement, tels que les peptides antimicrobiens, les agents modulant l'immunité (*e.g.* vaccins et immunostimulants), les pro- et prébiotiques, les extraits de plantes, les inhibiteurs ciblant les facteurs de virulences (*e.g. quorum-sensing*, biofilm ou toxines), les anticorps et les protéines de lyse. Il n'en demeure pas moins que l'un des grands avantages de la phagothérapie, lorsque appliquée aux pathogènes les plus fréquemment ciblés chez l'homme (entérobactéries, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*) et lorsque comparé au processus d'élaboration d'un nouvel antibiotique par exemple, est sa

grande capacité à être adaptable dans un délai assez court (de quelques jours à quelques semaines). Ainsi, il est tout à fait envisageable de développer rapidement et pour des coûts raisonnables de nouveaux traitements au fur et à mesure que les résistances bactériennes apparaîtront. Cette flexibilité, qui n'existe pas pour les antibiotiques et autres molécules chimiques, doit être préservée pour garantir sur le long terme l'utilisation des bactériophages comme arme antibactérienne. Ces points positifs ne doivent néanmoins pas effacer certaines difficultés rencontrées pour isoler des phages contre certaines souches bactériennes, particulièrement « phago-résistantes ». Il s'agit alors souvent d'une situation complexe où deux paramètres-clés conditionnent la probabilité de succès d'isolement d'un ou de plusieurs phages actifs : le temps et la pluralité – diversité des sources de bactériophages utilisés.

Remerciements. Nous remercions les membres de nos laboratoires respectifs pour leur participation aux travaux et activités du réseau Phages.fr. Nous remercions également les organismes qui financent nos activités au travers d'un réseau thématique pluridisciplinaire depuis 2016 : l'INSB-CNRS, l'INEE-CNRS et l'INRA. Nous tenons également à remercier chaleureusement le Dr Alain Dublanchet pour son soutien inconditionnel à nos travaux et son implication déterminante pour l'obtention du prix de la fondation François-Sommer Homme Nature 2018 attribué à notre réseau le 14 novembre 2018. Pour cette occasion, une version préliminaire de ce manuscrit a été conçue.

Note : certains passages de cette revue sont issus du manuscrit de thèse de Nicolas Dufour (http://www.theses.fr/2015USPCC259).

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Koskella B, Brockhurst MA. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 2014 ; 38(5) : 916-31.

2. Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 2010 ; 70 : 217-48.

3. Brussow H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* 2012 ; 434(2) : 138-42.

4. Expert round table on acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy, Sybesma W, Rohde C, *et al*. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy-part II. *Antibiotics (Basel)* 2018 ; 7(2) : E35.

5. Yarmolinsky MB, Sternberg N. Bacteriophage P. In: Calendar R (ed). *The bacteriophages*. Vol. 1. Springer US, 1998. pp. 291-438.

6. Saad AM, Askora A, Soliman AM, *et al*. Full genome sequence of a polyvalent bacteriophage infecting strains of *Shigella, Salmonella* and *Escherichia*. *Arch Virol* 2018 ; 163(11) : 3207-10.

7. Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, *et al*. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1998 ; 64(2) : 575-80.

8. Azam AH, Tanji Y. Peculiarities of Staphylococcus aureus phages and their possible application in phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019 ; 103(11) : 4279-89.

9. Bolocan AS, Callanan J, Forde A, Ross P, Hill C. Phage therapy targeting *Escherichia coli*-a story with no end? *FEMS Microbiol Lett* 2016 ; 363(22) : fnw256.

10. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, *et al*. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 2018 ; 16(12) : 760-73.

11. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 2013 ; 8(6) : 769-83.

12. Jault P, Leclerc T, Jennes S, *et al*. 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* 2019 ; 19(1) : 35-45.

13. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, *et al*. The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure? *Pharm Res* 2011 ; 28(4) : 934-7.

14. Dublanchet A, Fruciano E. A short history of phage therapy. *Med Mal Infect* 2008 ; 38(8) : 415-20.

15. Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage* 2012 ; 2(2) : 130-3.

16. Harper DR, McConville M, Anderson FJ, Enright MC. Antimicrobial phages. In : Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schartzman J (eds). *Molecular Medical Microbiology* 2nd Ed. Vol 1. London : Academic Press, 2015. pp. 567-82.

17. Kanji K, Saatci D, Rao GG, *et al*. Antibiotics for tonsillitis: should the emergency department emulate general practice? *J Clin Pathol* 2016 ; 69(9) : 834-6.

18. Pouillot F, Chomton M, Blois H, *et al*. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 ; 56(7) : 3568-75.

19. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against Staphylococcus aureus abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 20065 ; 49 : 1220-1.

20. Hung CH, Kuo CF, Wang CH, Wu CM, Tsao N. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 ; 55 : 1358-65.

21. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51(8) : 2765-73.

22. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol* 2006 ; 296(1) : 5-14.

23. Payne RJ, Jansen VA. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J Theor Biol* 2001 ; 208(1) : 37-48.

24. Cairns BJ, Timms AR, Jansen VA, Connerton IF, Payne RJ. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog* 2009 ; 5(1) : e1000253.

25. Weld RJ, Butts C, Heinemann JA. Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *J Theor Biol* 2004 ; 227(1) : 1-11.

26. Van Belleghem JD, Dabrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. Interactions between bacteriophage, bacteria and the mammalian immune system. *Viruses* 2018 ; 11(1) : E10.

27. Manrique P, Bolduc B, Walk ST, van der Oost J, de Vos WM, Young MJ. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113(37) : 10400-5.

28. Shkoporov AN, Hill C. Bacteriophages of the human gut: the "known unknown" of the microbiome. *Cell Host Microbe* 2019 ; 25(2) : 195-209.

29. Miernikiewicz P, Dabrowska K, Piotrowicz A, *et al*. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 2013 ; 8(8) : e71036.

30. Van Belleghem JD, Clement F, Merabishvili M, Lavigne R, Vaneechoutte M. Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa phages. *Sci Rep* 2017 ; 7(1) : 8004.

31. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard JD, Debarbieux L. Phage therapy of pneumonia is not associated with an over stimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2019 ; 63(8) : e00379.

32. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, *et al*. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* 2012 ; 83 : 73-121.

33. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 ; 49(7) : 2874-8.

34. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, *et al*. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* 2013 ; 443(2) : 187-96.

35. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with Pseudomonas aeruginosa. *Evol Med Public Health* 2018 ; 2018(1) : 60-6.

36. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, *et al*. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant Mycobacterium abscessus. *Nat Med* 2019 ; 25(5) : 730-3.

37. Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials. *Methods Mol Biol* 2018 ; 1693 : 159-70.

38. Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, *et al*. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive Pseudomonas aeruginosa septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. *Crit Care* 2017 ; 21(1) : 129.

39. Patey O, McCallin S, Mazure H, Liddle M, Smithyman A, Dublanchet A. Clinical indications and compassionate use of phage therapy: personal experience and literature review with a focus on osteoarticular infections. *Viruses* 2018 ; 11(1) : E18.

40. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, *et al*. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant acinetobacter baumannii infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2017 ; 61(10) : e02221-2318.

41. Ochs HD, Buckley RH, Kobayashi RH, *et al*. Antibody responses to bacteriophage phi X174 in patients with adenosine deaminase deficiency. *Blood* 1992 ; 80(5) : 1163-71.

42. Pyun KH, Ochs HD, Wedgwood RJ, Yang XQ, Heller SR, Reimer CB. Human antibody responses to bacteriophage phi X 174: sequential induction of IgM and IgG subclass antibody. *Clin Immunol Immunopathol* 1989 ; 51(2) : 252-63.

43. Rubinstein A, Mizrachi Y, Bernstein L, *et al*. Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage phi X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients. *AIDS* 2000 ; 14(4) : F55-62.

44. Dabrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, *et al*. Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol* 2014 ; 88(21) : 12551-7.

45. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51(8) : 2765-73.

46. Roach DR, Leung CY, Henry M, *et al*. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. *Cell Host Microbe* 2017 ; 22(1) : 38-47.e4.

47. Dufour N, Delattre R, Ricard JD, Debarbieux L. The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than by beta-lactams. *Clin Infect Dis* 2017 ; 64(11) : 1582-8.

48. Torres-Barcelo C, Hochberg ME. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol* 2016 ; 24(4) : 249-56.

49. Torres-Barcelo C. Phage therapy faces evolutionary challenges. *Viruses* 2018 ; 10(6) : E323.

50. Torres-Barcelo C, Arias-Sanchez FI, Vasse M, Ramsayer J, Kaltz O, Hochberg ME. A window of opportunity to control the bacterial pathogen Pseudomonas aeruginosa combining antibiotics and phages. *PLoS One* 2014 ; 9(9) : e106628.

51. Comeau AM, Tetart F, Trojet SN, Prere MF, Krisch HM. Phage-antibiotic synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One* 2007 ; 2(8) : e799.

52. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poult Sci* 2004 ; 83(12) : 1944-7.

53. Kamal F, Dennis JJ. Burkholderia cepacia complex phage-antibiotic synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. *Appl Environ Microbiol* 2015 ; 81(3) : 1132-8.

54. Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012 ; 65(2) : 395-8.

55. Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR. 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* 2009 ; 34(4) : 349-57.

56. McCallin S, Brüssow H. Clinical trials of bacteriophage therapeutics. In : Harper D, Abedon S, Burrowes B, McConville M, eds. *Bacteriophages: biology, technology, therapy*. Cham : Springer International Publishing, 2017.

57. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, *et al*. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBio Med* 2016 ; 4 : 124-37.

58. Sarker SA, Brussow H. From bench to bed and back again: phage therapy of childhood *Escherichia coli* diarrhea. *Ann N Y Acad Sci* 2016 ; 1372(1) : 42-52.

59. Rajesh Kannan V, Bastas KK, Rajendran S. Scientific and Economic Impact of Plant Pathogenic Bacteria. In : Rajesh Kannan V, Bastas KK, ed. *Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria*. First ed. CRC Press, 2015. pp. 370-92.

60. Jorgensen PS, Wernli D, Carroll SP, *et al*. Use antimicrobials wisely. *Nature* 2016 ; 537(7619) : 159-61.

61. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015 ; 370(1670) : 20140083.

62. Bianchi FJ, Booij CJ, Tscharntke T. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proc Biol Sci* 2006 ; 273(1595) : 1715-27.

63. Mallmann W, Hemstreet C. Isolation of an inhibitory substance from plants. *Agric Res* 1924 ; 28 : 599-602.

64. Buttimer C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 34.

65. Das M, Bhowmick TS, Ahern SJ, Young R, Gonzalez CF. Control of Pierce's disease by phage. *PLoS One* 2015 ; 10(6) : e0128902.

66. Zaczek M, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Phages in the global fruit and vegetable industry. *J Appl Microbiol* 2015 ; 118(3) : 537-56.

67. Christiansen RH, Dalsgaard I, Middelboe M, Lauritsen AH, Madsen L. Detection and quantification of Flavobacterium psychrophilum-specific bacteriophages *in vivo* in rainbow trout upon oral administration: implications for disease control in aquaculture. *Appl Environ Microbiol* 2014 ; 80(24) : 7683-93.

68. Wernicki A, Nowaczek A, Urban-Chmiel R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virol J* 2017 ; 14(1) : 179.

69. Hagens S, Loessner MJ. Phages of Listeria offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front Microbiol* 2014 ; 5 : 159.

70. Carter CD, Parks A, Abuladze T, *et al*. Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophage* 2012 ; 2(3) : 178-85.

71. Del Rio B, Sanchez-Llana E, Redruello B, *et al*. Enterococcus faecalis bacteriophage 156 is an effective biotechnological tool for reducing the presence of tyramine and putrescine in an experimental cheese model. *Front Microbiol* 2019 ; 10 : 566.

72. Jaomanjaka F, Ballestra P, Dols-lafargue M, Le Marrec C. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: insights into a novel group based on the integrase sequence. *Int J Food Microbiol* 2013 ; 166(2) : 331-40.

73. Ladero V, Gomez-Sordo C, Sanchez-Llana E, *et al*. Q69 (an *E. faecalis*-infecting bacteriophage) as a biocontrol agent for reducing tyramine in dairy products. *Front Microbiol* 2016 ; 7 : 445.

74. Philippe C, Jaomanjaka F, Claisse O, *et al*. A survey of oenophages during wine making reveals a novel group with unusual genomic characteristics. *Int J Food Microbiol* 2017 ; 257 : 138-47.

75. Philippe C, Krupovic M, Jaomanjaka F, Claisse O, Petrel M, le Marrec C. Bacteriophage GC1, a novel tectivirus infecting gluconobacter cerinus, an acetic acid bacterium associated with wine-making. *Viruses* 2018 ; 10(1) : E39.

76. Pirnay JP, Blasdel BG, Bretaudeau L, *et al*. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res* 2015 ; 32(7) : 2173-9.

77. Pirnay JP, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G. Bacteriophage production in compliance with regulatory requirements. *Methods Mol Biol* 2018 ; 1693 : 233-52.