

Génétique

Réf : 117 236

Titrage d'un virus bactériophage

Activité 3 - tampon PBS (réf. 107843)

Français – p 1

Version : 5202

1 INTRODUCTION

Cette activité a été réalisée en collaboration avec Laurent Debarbieux, Directeur de Recherche de l'unité « BACTÉRIOPHAGE, BACTÉRIE, HÔTE » à l'Institut Pasteur de Paris.

Les bactériophages sont des virus de bactéries et, avec les virus de plantes, ce sont les seuls virus que l'on peut manipuler en classe en toute sécurité.

La découverte de leur effet bactéricide au début du 20ème siècle a conduit à la mise au point de la phagothérapie, un procédé de lutte contre les bactéries pathogènes, employé avant l'usage des antibiotiques. L'utilisation abusive de ces derniers a contribué au développement et à la dissémination de bactéries qui sont devenues résistantes et on redécouvre aujourd'hui la phagothérapie comme une alternative possible aux antibiotiques.

Les bactériophages sont également le premier facteur limitant dans la croissance des bactéries utilisées dans l'agroalimentaire, par exemple les bactéries lactiques pour la fabrication des fromages. Lorsque des accidents de fabrication dus aux bactériophages surviennent, on réalise un titrage -un dénombrement des virus du milieu-, par la méthode des plages de lyse.

Quant à l'identification d'un bactériophage, elle se fait par séquençage du génome ou amplification d'une partie spécifique du génome par PCR puis révélation des produits de l'amplification par électrophorèse d'ADN.

Nous proposons ici une série de manipulations, réalisables en lycée général, en Biotechnologies ou dans les Classes Préparatoires aux Grandes Ecoles. Ces manipulations ont été mises au point en collaboration avec Laurent Debarbieux, Directeur de Recherche de l'unité « BACTÉRIOPHAGE, BACTÉRIE, HÔTE » à l'Institut Pasteur de Paris. Elles utilisent un couple bactérie-bactériophage, composé d'une E. coli de classe 1 et du bactériophage T4. L'Escherichia coli appartient à la souche CIP 54.117 (Type K12). Son utilisation est autorisée en lycée Général et technique.

Trois activités pratiques sont proposées dans ce dossier. Elles sont réalisables ensemble ou indépendamment les unes des autres selon le niveau de la classe et les objectifs du professeur.

Ces activités proposées permettent :

- **de comparer in vitro l'effet bactéricide des bactériophages à celui de deux antibiotiques**, dont un est inefficace et de comprendre ainsi le regain d'intérêt pour la phagothérapie.

Cette activité permet par exemple de montrer que des virus, extraits d'un environnement naturel, peuvent être utilisés comme arme thérapeutique contre certaines bactéries pathogènes et représenter une alternative à l'usage des antibiotiques. Les limites scientifiques et légales de la phagothérapie sont évoquées dans le paragraphe « LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET LEGAL DE L'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES EN MEDECINE » de ce dossier.

- **de réaliser un test PCR sur virus**, en caractérisant la présence du bactériophage T4 dans la suspension. Les produits de l'amplification sont révélés par électrophorèse d'ADN. Cette activité permet aux élèves de comprendre comment un « test-PCR » révèle la présence d'un virus spécifique. Elle est en lien direct avec le principe des tests réalisés afin d'identifier le SARS-COV-2 lors de la pandémie de COVID19.

- **de réaliser un titrage pour dénombrer les bactériophages** présents dans la suspension mère. La technique du « spot test » employée ici utilise les plages de lyse formée par le virus sur la culture bactérienne. Cette technique permet de dénombrer les entités biologiques présentes dans la suspension alors qu'elles ne sont pas visibles au microscope optique. On a donc ici une approche d'une numération indirecte, qui complète les numérations par observation directe au microscope, réalisées en classe de Seconde et Première, Générales ou Technologiques.

Ces activités peuvent également être associées entre elles, par exemple :

- 1) En montrant qu'un liquide extrait d'un environnement naturel peut avoir un effet bactéricide,
- 2) En recherchant « le principe actif » de cet effet bactéricide. L'observation microscopique ne montre la présence d'aucun agent biologique visible. Cet agent est donc plus petit qu'une bactérie. La PCR révèle que des entités biologiques contenant de l'ADN sont présentes dans le liquide bactéricide. Il s'agit d'un virus : le bactériophage T4.
- 3) En dénombrant les virus présents dans ce liquide alors qu'ils ne sont pas visibles au microscope

LE LIEN AVEC LES PROGRAMMES

En lycée général, Première et Terminale Spécialité SVT

Le programme de Spécialité SVT en classe de Première amène les élèves à appliquer les mécanismes de l'évolution aux populations bactériennes. Des mutations spontanées ou induites se produisent aléatoirement dans les populations de bactéries et certaines confèrent des résistances aux antibiotiques. L'application d'un antibiotique sur une population bactérienne sélectionne les mutants résistants à cet antibiotique, d'autant plus qu'il élimine les bactéries compétitrices sensibles et permet donc leur développement numérique. L'utilisation systématique de traitements antibiotiques en santé humaine comme en usage agronomique ou vétérinaire conduit à augmenter la fréquence des formes résistantes dans les populations naturelles de bactéries et aboutit à des formes simultanément résistantes à plusieurs antibiotiques. Cela constitue un important problème de santé publique car le nombre de familles d'antibiotiques disponibles est limité. D'autres pratiques plus responsables doivent donc être recherchées. La phagothérapie, mise au point au début du XXème siècle, est une alternative possible à l'utilisation des antibiotiques contre certaines bactéries.

Les principes biologiques sur lesquels repose cette technique médicale peuvent aussi être reliés aux mécanismes de l'immunité du programme de Première, puisque des études récentes ont montré la synergie nécessaire entre immunité innée et bactériophages pour la réussite de la phagothérapie. La relation bactérie-bactériophage peut également être un support pour aborder les transferts génétiques horizontaux, puisque ceux-ci peuvent survenir lorsque les bactériophages tempérés sont dans un cycle lysogénique.

En Terminale STL

Le programme de biochimie, biologie et biotechnologies de terminale amène les élèves à découvrir les cycles infectieux des bactériophages. Leur dénombrement par la technique du spot-test, qui utilise les plages de lyse, est réalisé.

En CPGE Biologie Chimie Physique et Sciences de la Terre

Les bactériophages sont étudiés comme un exemple de virus. Le génome viral est comparé à celui des Bactéries et des Eucaryotes et la PCR est présentée comme une technique d'étude des génomes. Les cycles de développement viraux sont étudiés.

2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La manipulation mise en œuvre consiste à déterminer le titre d'une suspension de bactériophages. Cette technique dite « du spot-test » utilise le principe des plages de lyse. La plage de lyse obtenue après dépôt d'une suspension de bactériophages sur une culture bactérienne correspond en fait à la confluence d'une multitude de « micro-plages de lyse », chacune d'elle étant le résultat de l'action d'un seul bactériophage. Par une série de dilutions successives de la suspension mère, on réduit le nombre de bactériophages dans les dépôts effectués sur la culture de bactéries. On voit alors apparaître, à partir d'une certaine dilution, des « micro-plages » de lyse. Le comptage de ces micro-plages permet de déterminer le nombre de bactériophages présents dans la goutte déposée et par calcul de déterminer le nombre de virus présents dans la suspension de départ. Le titre de la suspension est alors donné en UFP.mL⁻¹ (UFP=Unité Formant Plage).

Matériel complémentaire pour le titrage de la suspension de bactériophages :

Micropipettes 10-100µL, 100-1000µL et cônes adaptés

Microtubes à hémolyses (en fonction du nombre de dilution de bactériophages)

20 mL de tampon PBS stérile en flacons individuels (autant que de postes élèves) : pour 1000mL de tampon PBS : 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,42g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄

La préparation du champ opératoire et la technique d'ensemencement des boîtes de pétri par les bactéries restent les mêmes que celles employées pour mettre en évidence l'effet bactéricide des bactériophages.

Reproduire sur la face inférieure de la boîte le schéma ci-dessous. Le nombre de dilutions à réaliser varie selon le titre de départ de la suspension. La dilution maximale à 10⁻⁷ n'est donc ici qu'indicative et on peut donc réaliser une seconde boîte avec les la suspension mère et les dilutions suivantes 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰...

Préparation des dilutions en cascade de la suspension de bactériophages

Annoter les tubes de dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁷

A l'aide la micropipette 100-1000µL, distribuer 900µL de Tampon PBS dans 7 tubes à hémolyse

Ouvrir le tube de solution mère de bactériophages

Prélever à l'aide de la micropipette 10-100 µL, 100µL de la solution mère de bactériophages

Fermer le tube de solution mère

Ouvrir le tube 10⁻¹

Y introduire les 100µL de bactériophages, homogénéiser par pipetage doux.

Sans changer de cône, prélever 100 µL de cette dilution 10⁻¹

Fermer le tube 10⁻¹

Ouvrir le tube 10⁻²

Dépôt des gouttes de dilution de bactériophages

En conditions stériles, à l'aide de la micropipette 2-20 µL, déposer 5 µL de suspension de bactériophages en commençant par la plus faible dilution. On pourra ainsi garder le même cône.

Déposer également 1 goutte de tampon PBS pur et 1 goutte de solution mère de bactériophages

Jeter les cônes de micropipette dans le pot d'eau de Javel

Remarque : si la goutte ne tombe pas spontanément du cône, on peut la faire adhérer à la gélose en la déposant délicatement (sans percer la gélose).

Après le TP :

Après absorption des gouttes de bactériophages, les boîtes sont incubées à l'envers à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les boîtes sont ensuite stockées à l'envers parafilmées au réfrigérateur en attendant la lecture par les élèves. Les élèves disposeront de solution de désinfection de paillasse, de savon et de gel hydroalcoolique avant et après la manipulation des boîtes.

3 RÉSULTAT ET EXPLOITATION

La manipulation mise en œuvre consiste à déterminer le titre d'une suspension de bactériophages. Cette technique dite « du spot-test » utilise le principe des plages de lyse. La plage de lyse obtenue après dépôt d'une suspension de bactériophages sur une culture bactérienne correspond en fait à la confluence d'une multitude de « micro-plages de lyse », chacune d'elle étant le résultat de l'action d'un seul bactériophage. Par une série de dilutions successives de la suspension mère, on réduit le nombre de bactériophages dans les dépôts effectués sur la culture de bactéries. On voit alors apparaître, à partir d'une certaine dilution, des « micro-plages » de lyse (figures 12 à 14). Le comptage de ces micro-plages permet de déterminer le nombre de bactériophages présents dans la goutte déposée et par calcul de déterminer le nombre de virus présents dans la suspension de départ (figures 15 et 16). Le titre de la suspension est alors donné en UFP.mL⁻¹ (UFP=Unité Formant Plage).

Un logiciel de traitement d'images, tel que Mesurim 2, peut faciliter le comptage des « micro-plages » de lyse (figure 15).

Figure 12 : résultat d'une culture d'E. coli avec dépôt de bactériophages, dilution de 10 en 10 jusqu'à 10⁻⁵

SM = suspension mère, Tp PBS = tampon PBS, cercle rouge = plage de lyse de la dilution 10⁻²

Figure 13 : détail de l'effet des dilutions 10-3 à 10-5 sur la culture bactérienne

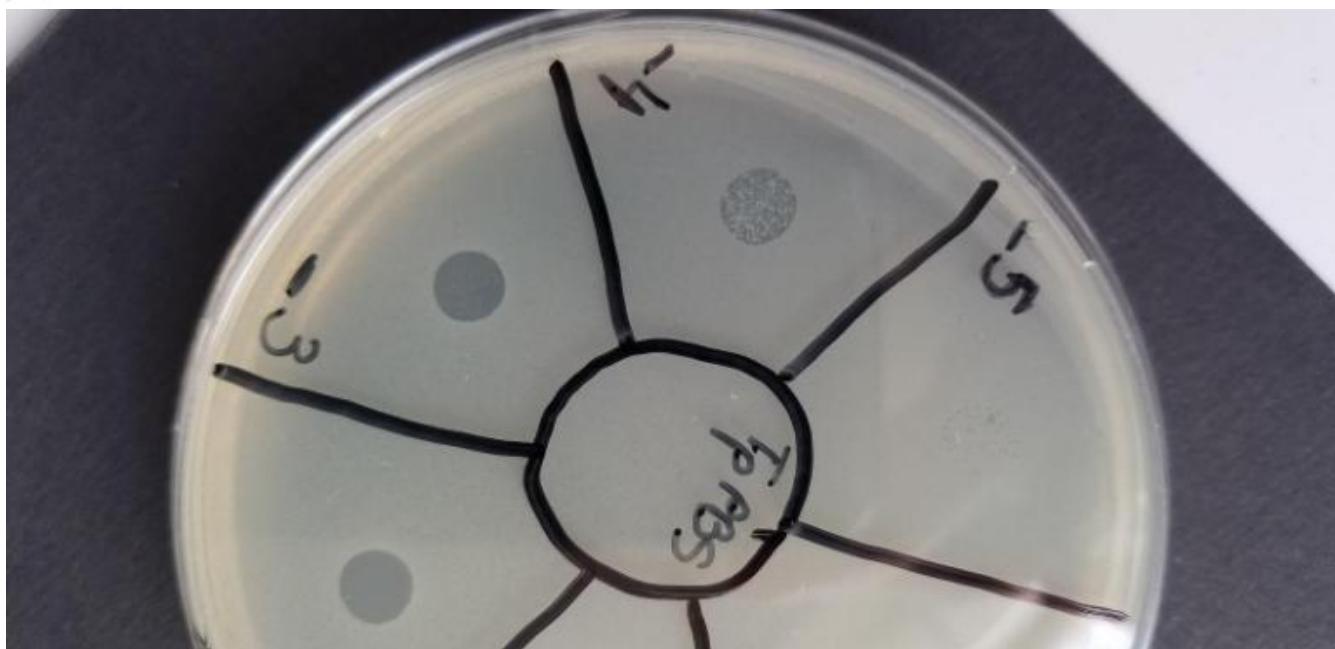
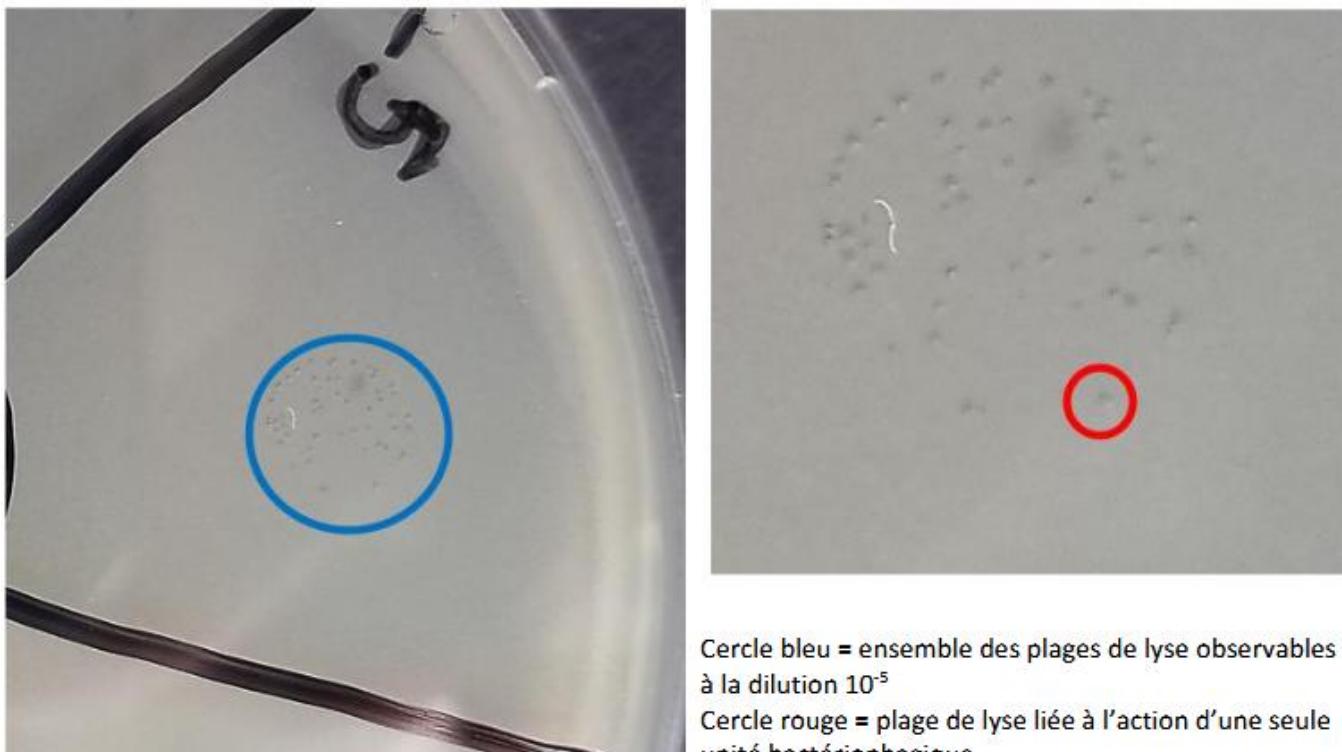


Figure 14 : détails de l'effet de la dilution 10-5 sur la culture bactérienne



Cercle bleu = ensemble des plages de lyse observables
à la dilution 10⁻⁵
Cercle rouge = plage de lyse liée à l'action d'une seule
unité bactériophagique.

Figure 15 : copies d'écran du logiciel Mesurim2. Comptage des plages de lyse à la dilution 10⁻⁵



49 plages de lyses sont comptabilisées à la dilution 10⁻⁵, ce qui correspond à 49 unités bactériophagiennes. Chacune d'elle est à l'origine d'une plage de lyse. Autrement dit, cela signifie que la goutte de 5µL déposée sur la culture bactérienne contenait 49 virus. On peut alors retrouver le nombre de virus présents dans 5µL de la suspension mère et ainsi déterminer le titre de cette suspension en UFP.mL⁻¹ (voir figure).

Figure 16 : tableau présentant le nombre de virus dans chaque goutte déposée et le titre de chaque dilution (SM=suspension mère)

Dilutions	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM
Nombre d'unités bactériophagiennes dans la goutte déposée (volume 5µL)	49	490	4900	49 000	490 000	4 900 000
Nombre d'unités bactériophagiennes dans 1mL (UFP.mL ⁻¹)	$9,8 \cdot 10^3$	$9,8 \cdot 10^4$	$9,8 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^8$

On peut ainsi déterminer le titre de la suspension mère par la formule :

$$Tm = \frac{n * 1000}{v * d}$$

Tm=titre de la suspension mère (en UFP.mL⁻¹), n=nombre de plages comptées à la dilution d, v=volume de la goutte déposée (en µL), d=dilution de la suspension de comptage.

Soit dans notre exemple :

$$Tm = \frac{49*1000}{5*10^{puissance-5}} = 9,8 \cdot 10^8$$

Le titre de la suspension mère est donc ici d'environ 1 Millard UFP/mL.

Dans la pratique, en laboratoire de recherche, on reproduit chaque dilution trois fois de façon à limiter les erreurs et à affiner le titre par une moyenne des comptages. En classe, il sera aisément de travailler sur un nombre de comptage assez élevé en faisant réaliser les mêmes dilutions à plusieurs groupes de travail.

4 BIBLIOGRAPHIE ET SITOGRAPHIES

Wikipédia. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Bactériophage>

NCBI, Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes, F.

Ravat, P. Jault, et J. Gabard.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665175/#B1>

Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy Anne Bruttin and Harald Brüssow* Nestlé Research Center, Nestec Ltd., Vers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland Received 25 November 2004/Returned for modification 24 January 2005/Accepted 3 April 2005

Les bactériophages en pratique clinique : suivez le guide ! Anthia MONRIBOT, Raphaëlle DELATTRE, Nicolas DUFOUR, Camille d'HUMIERES, Nathalie PONS-KERJEAN, Julie BATAILLE
https://cnhim.org/wp-content/uploads/2021/10/Guide_Pratique_sur_les_bacteriophages_2021.pdf

Structure and assembly of bacteriophage T4 head, Venigalla B Rao & Lindsay W Black, décembre 2010.

<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-356>

Bacteriophage T4 Genome, Eric S. Miller, Elizabeth Kutter, Gisela Mosig, Fumio Arisaka, Takashi Kunisawa, and Wolfgang Rüger, mars 2033.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150520/>

Logiciel Mesurim 2 :

<https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/mesurim2/>

Enterobacteria phage T4, complete genome - Nucleotide - NCBI (nih.gov)
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000866.4?from=104945&to=106510&report=genbank

5 ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour toute question, veuillez contacter

N° Cristal : 09 69 32 02 10

Appel non surtaxé

6 DOSSIER D'EXPERIENCE

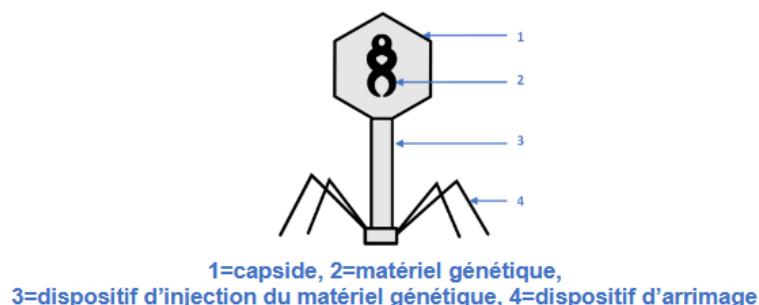
LE CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET LEGAL DE L'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES EN MEDECINE

Les bactériophages et leur structure

Les bactériophages sont des virus n'infectant que des bactéries. Leur taille est comprise entre 20 et 200nm. Ils sont constitués d'une enveloppe protéique externe (la capsid) protégeant le matériel génétique. Pour une majorité des bactériophages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin, mais il peut être aussi constitué d'ADN simple-brin, d'ARN simple-brin, ou d'ARN double-brin. S'il existe différentes morphologies de bactériophages, la structure commune est la même. Elle comporte au minimum (figure 1) :

- le matériel génétique, en général contenu dans une capsid,
- un dispositif d'arrimage à la bactérie cible,
- un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie.

Figure 1 : structure d'un bactériophage



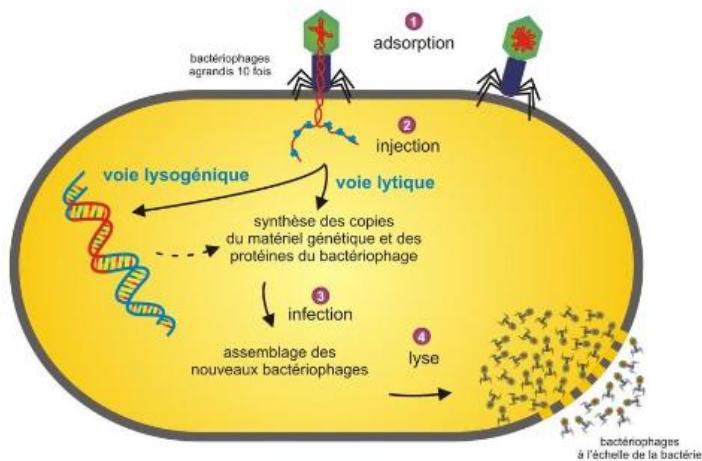
Le cycle de reproduction des bactériophages

Selon leur cycle biologique, on distingue deux types de bactériophages : les virulents et les tempérés (figure 2).

Les bactériophages virulents détruisent la bactérie. Ils détournent la machinerie bactérienne à leur profit pour se reproduire et se multiplier. Au terme du processus appelé cycle lytique, la bactérie éclate et plusieurs dizaines de nouveaux bactériophages – identiques à l'original – sont libérés dans le milieu et donc disponibles pour s'attaquer à d'autres bactéries de la même espèce.

Les bactériophages tempérés sont dotés de la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien. Ce cycle est dénommé cycle lysogénique. Les bactériophages peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non (gènes de virulence par exemple). Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps – tels des « agents dormants », tapis dans le génome bactérien avant d'entamer leur reproduction et d'entrer dans un cycle lytique.

Figure 2 : les cycles lytiques et lysogéniques



Source : Institut Pasteur, Laurent Debarbieux. <https://research.pasteur.fr/fr/team/group-laurent-debarbieux/>

La place des bactériophages dans la nature

Les bactériophages, bien que peu connus du grand public, représentent les entités biologiques les plus abondantes de la planète. Leur nombre serait compris entre 10³⁰ et 10³². On dénombre en moyenne 10 millions de bactériophages par mL dans les milieux liquides et jusqu'à 1 milliard dans les sédiments. Leur abondance est donc considérable. Ils seraient apparus sur terre avec les premières bactéries. Leur ancienneté est ainsi estimée à plusieurs milliards d'années. Les bactériophages représentent la forme de vie la plus variée sur Terre. Pour chaque bactérie connue, il existe en effet, au moins un bactériophage identifié (en moyenne 10 à 100). On trouve des bactériophages dans tous les écosystèmes, y compris dans des milieux aussi hostiles que les déserts et même dans la neige vierge. L'espèce humaine héberge elle aussi de nombreux phages : peau, muqueuses, et surtout tube digestif, dans lequel on trouve au moins autant de bactériophages que de bactéries.

La phagothérapie et son histoire

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de moyens thérapeutiques ont ramené sur le devant de la scène une méthode ancienne de soins contre les infections bactériennes : la phagothérapie. Les armes utilisées contre les bactéries sont ici des virus de bactéries : les bactériophages. Tombée dans l'oubli depuis un demi-siècle du côté occidental de l'ex-rideau de fer, la phagothérapie fait toujours partie de l'arsenal thérapeutique des pays de l'ex-URSS, au point de constituer une arme de choix dans la politique de santé publique de ces pays.

C'est en observant des « plages claires » au sein d'une culture de bactéries sur gélose en 1917 que le franco-canadien Félix D'Hérelle (figure 3) a formulé l'hypothèse d'une part que ces plages claires correspondaient à une lyse bactérienne et d'autre part que cette lyse pouvait être provoquée par un agent inconnu qu'il nomme "bactériophage", littéralement "le mangeur de bactéries". D'Hérelle isole en quelques mois des bactériophages actifs contre plusieurs espèces bactériennes. Dès 1918, il imagine un usage thérapeutique du bactériophage qu'il concrétise en 1919 par le traitement (avec succès) d'enfants victimes de dysenterie bacillaire hospitalisés à l'hôpital Necker de Paris. La phagothérapie est née.

La méthode proposée par D'Hérelle fait la preuve de son efficacité avec notamment le traitement de cas de peste en Égypte durant l'année 1925 et son utilisation pour juguler une épidémie de choléra en Inde en 1926. Ces premiers succès ont eu un retentissement tel qu'ils sont le point de départ d'une véritable « mondialisation » de la phagothérapie. Pour la première fois, dès le début des années 30, le monde médical semble enfin disposer d'une arme efficace pour traiter les infections bactériennes.

Malheureusement, ceux qui prétendent à l'époque mettre en œuvre la phagothérapie proposée par D'Hérelle, n'ont pas sa rigueur de travail. De nombreux échecs surviennent, créant à la fois doutes et polémiques autour de la phagothérapie. Le coup de grâce a été porté à la phagothérapie par deux évènements successifs : la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, puis la seconde guerre mondiale qui a généré des besoins immenses en traitements anti-infectieux. Dans ces conditions il est facile de comprendre la production de masse d'antibiotiques (plus aisés à fabriquer, plus stables et plus simples d'emploi) suivie de la montée en charge des grandes firmes pharmaceutiques qui en résultera. La seconde guerre mondiale a été le promoteur de l'âge d'or de l'antibiothérapie. Heureusement pour la phagothérapie, la guerre froide a interdit à la médecine des pays d'Europe de l'Est l'accès aux antibiotiques produits par l'industrie pharmaceutique occidentale. Depuis la chute des régimes communistes de l'Est et l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, la phagothérapie bénéficie d'un regain d'intérêt de la part des thérapeutes occidentaux comme en témoigne la progression du nombre de publications consacrées au bactériophage depuis les années 2000 (figure 4).

Toutefois la phagothérapie n'est pas un remède miracle. Elle présente certaines limites. Dans la mesure où, comme pour les antibiotiques, la cible des bactériophages est une bactérie, il ne faut en espérer aucun bénéfice sur les infections fongiques, parasitaires et virales. L'efficacité de la phagothérapie chez l'humain est limitée aux seules infections où le bactériophage peut être amené au contact de la bactérie. Le traitement des septicémies ou des infections parenchymateuses paraît voué à l'échec puisque les bactériophages injectés dans le milieu intérieur seront détruits par le système immunitaire. De la même manière il ne faut en attendre aucun bénéfice sur les infections produites par des bactéries intracellulaires.

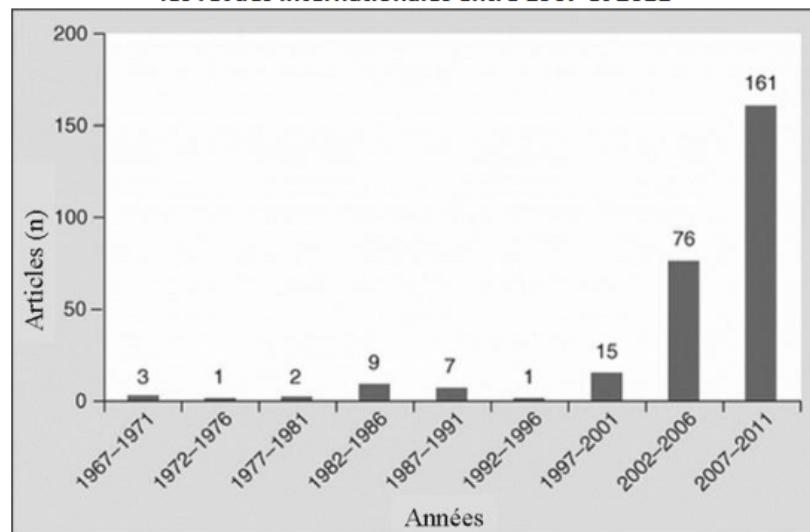
Même si l'apparition d'une résistance ne semble pas aussi problématique qu'avec les antibiotiques et afin de garantir une efficacité thérapeutique optimale, il est recommandé que le produit utilisé en phagothérapie contienne au moins trois bactériophages différents, actifs sur la souche bactérienne à traiter. Le titre de la solution doit également s'avérer suffisant, c'est-à-dire dépasser le seuil de 105 PFU/mL (pFU = phages formant unité).

Enfin, les solutions à usage thérapeutique ne doivent contenir que des bactériophages virulents et jamais de bactériophages tempérés, car avec ces derniers, existent des risques de transferts géniques horizontaux entre la bactérie et les bactériophages.

Figure 3 : Félix d'Hérelle,
vers 1905



Figure 4 : articles consacrés aux bactériophages et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011



Le statut réglementaire de l'utilisation clinique des bactériophages

A ce jour, l'utilisation thérapeutique des bactériophages est empirique. Malgré leur large utilisation en Europe de l'Est, les données cliniques sont limitées. Très peu d'essais cliniques conformes aux standards actuels en termes de recherche biomédicale ont été conduits (randomisation, essais contrôlés, double aveugle...).

En juin 2015, l'Agence européenne du médicament a organisé un colloque sur les bactériophages (« Workshop on the therapeutic use of bacteriophages ») avec pour objectif d'échanger sur les problématiques liées aux développements des traitements par bactériophages. Il a été admis lors de ce colloque que le traitement par les bactériophages s'inscrit dans le cadre réglementaire européen applicable aux médicaments biologiques, tel que défini dans la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 modifiée par la directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Cette directive impose qu'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) soit délivrée Dans la mesure où, à ce jour, aucun développeur ou industriel n'a introduit de demande d'AMM en France et en Europe pour des suspensions-lyophilisats de bactériophages et dans un contexte de sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a encadré et autorisé la mise à disposition de suspensions- lyophilisats de bactériophages comme « matière première ». Les professionnels de santé souhaitant utiliser des bactériophages seront en charge de la préparation, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique : reconstitution et dilution de ces matières premières.

Des tests de l'effet antibactérien des bactériophages réalisés *in vivo*

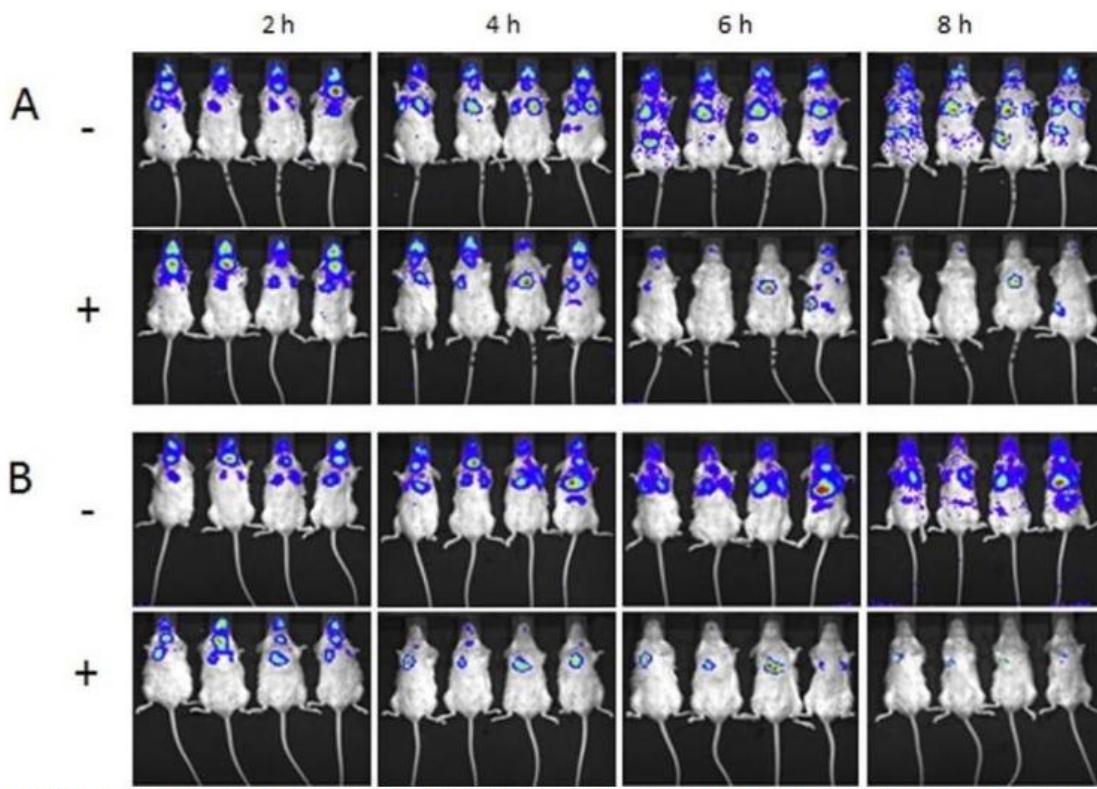
Les expériences décrites ci-après visent à tester l'effet de bactériophages sur la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*. Cette dernière est une cause fréquente d'infection des poumons chez des patients atteints de mucoviscidose. La formation du mucus qui protège les bactéries et la résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas* sont des problèmes majeurs qui peuvent compliquer la thérapie antibiotique.

En 2012, Alemayehu et son équipe ont évalué l'efficacité de l'utilisation de bactériophages pour éliminer *Pseudomonas aeruginosa* dans le poumon murin. Ils ont isolé et caractérisé deux bactériophages d'une station d'épuration locale, un myovirus (ϕ NH-4) et un podovirus (ϕ MR299-2). Les deux bactériophages étaient actifs *in vitro* contre des isolats cliniques de *P. aeruginosa*. Les deux bactériophages utilisés ensemble ont détruit les 9 souches d'isolats cliniques testées, que ces souches soient mucoïdes ou non mucoïdes. Ce mélange de phages a également été efficace pour éliminer l'agent pathogène dans les poumons murins contenant de 1.107 à 2.107 bactéries. *Pseudomonas* a été efficacement éliminé (réduit d'une ampleur d'au moins 3 à 4 unités logarithmiques) des poumons murins en 6h. Leur étude démontre l'efficacité de ces deux bactériophages pour éliminer *Pseudomonas* dans le poumon murin et soutient l'intérêt croissant pour l'utilisation de la phagothérapie pour le contrôle et le traitement des infections pulmonaires à *Pseudomonas* multirésistantes, notamment chez des patients atteints de mucoviscidose.

Dans l'expérience d'Alemayehu et de ses collaborateurs, huit souris sont infectées par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* produisant du mucus (groupe A) et huit autres souris sont infectées par une souche de *Pseudomonas* ne produisant pas de mucus (groupe B). Les souris (+) sont traitées avec le mélange de bactériophages ϕ MR299-2 et ϕ NH-4B. Les bactériophages sont administrés 2 h après l'infection des souris par *Pseudomonas*. Les souris témoins (-) ne reçoivent pas le mélange de bactériophages.

La quantité de bactéries présentes chez les souris est évaluée par luminescence. Le nombre de bactéries pathogènes est proportionnel à l'intensité et à la surface de luminescence (figure 5).

Figure 5 : résultats de l'expérience d'Alemayehu et de ses collaborateurs



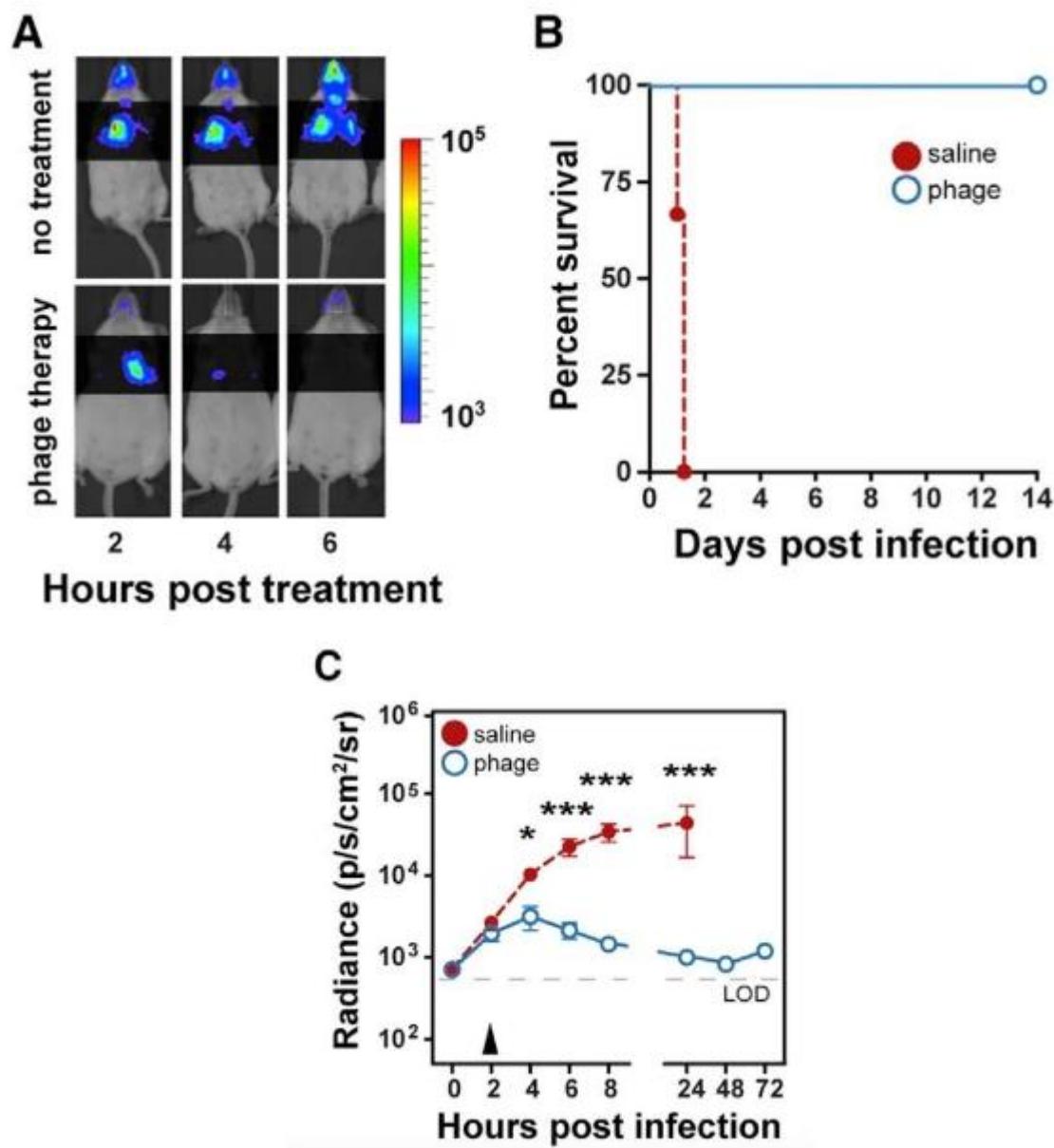
Source : NCBI, Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 Can Eliminate Pseudomonas aeruginosa in the Murine Lung and on Cystic Fibrosis Lung Airway Cells. Debebe Alemayehu and al. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302570/>

En 2017, une équipe américaine dirigée par Dwayne R. Roach et une équipe française, dirigée par Laurent Debarbieux ont collaboré pour étudier les effets du système immunitaire de l'hôte sur l'efficacité de la phagothérapie dans le cas de pneumonie aiguë causée par *Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle murin. Leur étude a révélé qu'une synergie neutrophile-bactériophage est essentielle à l'élimination du pathogène. Cette étude a également montré que les bactériophages utilisés ne sont pas éliminés par les cellules effectrices immunitaires pulmonaires et sont immunologiquement bien tolérés par les tissus pulmonaires.

Dans leur étude, des souris sont infectées par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Les souris « phage therapy » sont traitées avec le bactériophage PAK_P1. Les bactériophages sont administrés 2h après l'infection des souris par *Pseudomonas*. Les souris témoins « no treatment » ont reçu dans le même temps une solution saline. Traitement aux phages et solution saline sont tous deux introduits dans les voies respiratoires par instillation intranasale.

La quantité de bactéries présentes dans les poumons de souris a été évaluée par luminescence (figure 6, document A). Le pourcentage de souris survivantes est indiqué dans le document B. le document C indique la charge bactérienne mesurée par luminescence. La flèche indique le moment d'introduction des bactériophages.

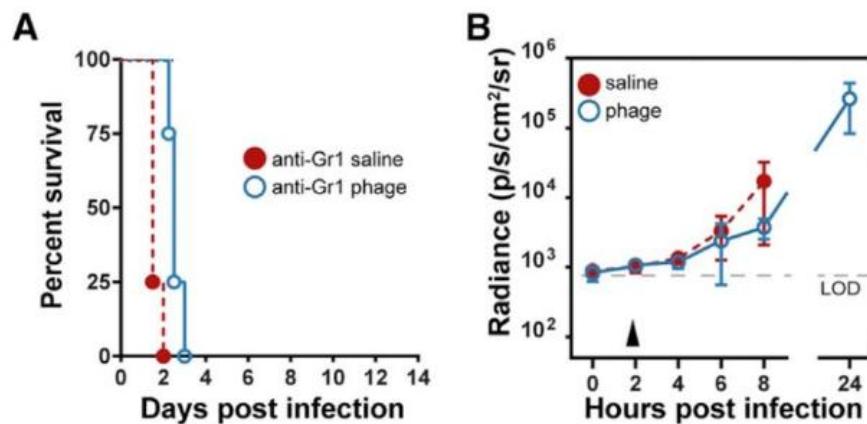
Figure 6 : Résultats de l'utilisation de bactériophages sur des souris dont le système immunitaire est fonctionnel



D'autres souris sont placées dans les mêmes conditions que précédemment mais reçoivent également une solution « d'anti-GR1 » qui neutralisent un type de cellules immunitaires, les granulocytes neutrophiles.

Le document A (figure 7) présente le taux de souris survivantes, le document B indique la charge bactérienne mesurée par fluorescence. La flèche indique le moment d'introduction des bactériophages. On constate que la neutralisation des neutrophiles provoque la mortalité de toutes les souris, traitées ou non traitées, alors qu'en absence de neutralisation des cellules immunitaires, les souris traitées guérissent et survivent.

Figure 7 : Résultats de l'utilisation de bactériophages sur des souris dont les neutrophiles ont été neutralisés



Source : Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. Dwayne R. Roach, Chung Yin Leung, Marine Henry, Eric Morello, Devika Singh, James P. Di Santo, Joshua S. Weitz, and Laurent Debarbieux, *Cell Host & Microbe* 22, 38–47, July 12, 2017

Le bactériophage T4

Les bactériophages de type T4 sont omniprésents dans la nature et occupent des niches environnementales allant de l'intestin des mammifères au sol, aux eaux usées et aux océans. Le bactériophage T4 est un virus de la famille des Myoviridae et de l'ordre des Caudovirales qui s'attaque à la bactérie Escherichia coli (E. coli). Sa structure comporte trois grandes parties : la capsidé contenant l'ADN double brin, la queue permettant l'injection de cet ADN dans la bactérie infectée et les fibres caudales permettant l'attachement du bactériophage sur la membrane de la bactérie (figure 8). La capsidé est structurée par deux protéines majeures : gp23 et gp24, ainsi que deux protéines non essentielles, Hoc et Soc, qui décorent la surface de la capsidé (figure 9). Le génome complet comporte 168 903 pb qui codent environ 300 produits d'expression.

C'est ce bactériophage que nous utilisons pour nos manipulations.

Figure 8 : structure du bactériophage T4

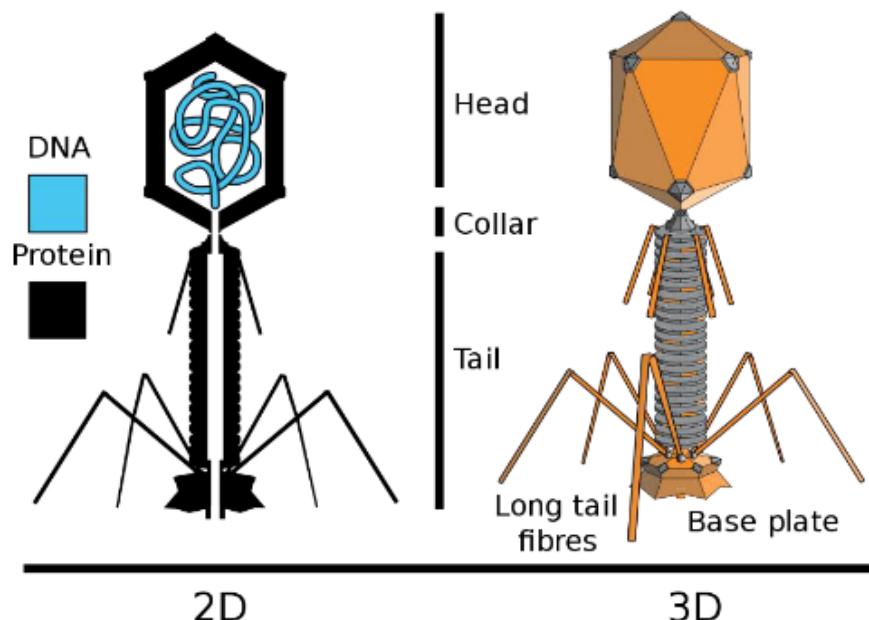
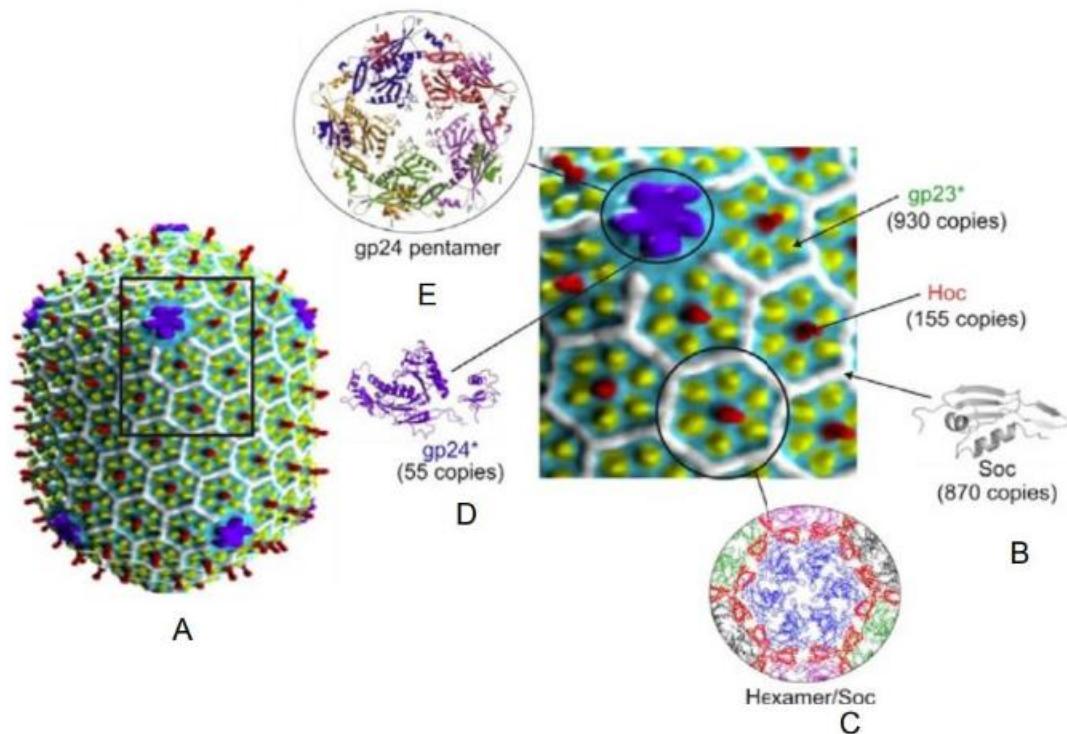


Figure 9 : structure de la capsidé du phage T4



A= modélisation 3D de la capsidé. L'agrandi montre la gp23 (représentée au jaune), la gp24 (représentée en bleu), Hoc (en rouge) et Soc (en blanc).

Source : Structure and assembly of bacteriophage T4 head, Venigalla B Rao & Lindsay W Black, décembre 2010.

Une étude publiée en 2005 par Anne Bruttin et Harald Brüssow montre l'innocuité du bactériophage T4 chez l'humain. T4 cible Escherichia coli mais n'a qu'une gamme d'hôtes étroite sur E. coli. T4 n'est donc pas un candidat probable pour la phagothérapie, mais a été choisi par Bruttin et Brüssow comme substitut pour un premier essai d'innocuité car il a été complètement séquencé et largement caractérisé. 40 ans de recherche génétique avec T4 n'ont pas identifié des gènes de virulence sur son chromosome. Dans cet essai sur l'utilisation de bactériophages par voie orale, aucun effet indésirable significatif n'a été observé chez les volontaires et les traitements ont été bien tolérés. L'absence de réponse immunitaire anti-T4 chez les volontaires suggère par ailleurs qu'aucune quantité substantielle de bactériophage T4 n'est jamais passée dans leur circulation sanguine. Le bactériophage T4 peut donc être utilisé en classe sans risque par les élèves ou les étudiants.