

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2019

Thèse n°04-2019

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Travail effectué dans l'équipe « Pathogénie des Staphylocoques » du Centre International de
Recherche en Infectiologie de Lyon

Sous la direction du Dr Jérôme JOSSE

Soutenu devant le jury interrégional le 12 mars 2019

Par Camille KOLENDA
Née le 10 août 1992, à Oullins (69)

Conformément aux dispositions du décret n°90-180 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Phagothérapie et infections ostéo-articulaires :
évaluation de l'activité antibiofilm et antibactérienne intracellulaire
d'un assemblage de trois bactériophages anti-*Staphylococcus aureus***

JURY

Président : Pr. Frédéric LAURENT – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Directeur : Dr. Jérôme JOSSE – Maître de Conférence des Universités
Membres : Pr. Tristan FERRY – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Dr. Claude-Alexandre GUSTAVE – Assistant Hospitalo-Universitaire
Mr. Mathieu MEDINA – Chef de Projet chez Pherecydes Pharma

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	Frédéric FLEURY
• Présidence du Conseil Académique	Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	Fabrice VALLEE
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB - Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU - HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU - PH)
Monsieur Waël ZEINYEYH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDİ-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU - PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU - PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Xavier ARMOIRY (PU - PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU - PH)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU - PH - HDR)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
 Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
 Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU - HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU - PH)
 Madame Catherine RIOUFOL (PU - PH)
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
 Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU - PH)
 Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
 Madame Florence RANCHON (MCU- PH)
 Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)
 Madame Delphine HOEGY (AHU)
 Monsieur Florian VAUTRIN (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU - PH)
 Madame Léa PAYEN (PU - PH)
 Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU - PH - HDR)
Monsieur Michel TOD (PU - PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU - PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU - PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU - HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr – enseignant contractuel temps partiel)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU - PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU - PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (AHU)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Frédéric LAURENT (PU - PH - HDR)
Madame Florence MORFIN (PU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (Pr)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU - PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU - PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)
Madame Camille LOURS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE – BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU - PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH - HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU - HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
Monsieur Alexandre JANIN (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU – enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU - enseignant contractuel temps partiel)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements

Aux membres du jury

Pr. Frédéric LAURENT, Président du Jury

Merci de m'avoir confié ce sujet de thèse mais surtout pour toutes les opportunités et chances que tu m'as offertes depuis mon premier stage de bactériologie et pour la confiance que tu m'accordes. Je suis admirative de ta passion au travail et ton enthousiasme communicatif, de l'énergie que tu peux rassembler pour gérer tes 10ⁿ casquettes, tout en faisant attention et en te démenant pour l'équipe qui t'entoure. Merci pour nos échanges transparents et sans filtre ... sans t'offusquer de mon franc parler ! Je suis ravie de poursuivre l'aventure dans l'équipe après quelques mois outre-Manche.

Dr. Jérôme JOSSE, Directeur de thèse

On a débarqué en même temps sur la planète Laurentienne ... Chef, merci de m'avoir prise sous ton aile depuis le M2, pour ton aide pour la réalisation de cette thèse, pour tes encouragements et ton écoute lors de mes nombreuses interrogations très philosophiques sur la phagothérapie et plus largement la science mais surtout la vie ! Je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler avec toi pour la suite, la vraie thèse ... et accessoirement sur la diplomatie ... ☺

Pr. Tristan FERRY

Merci pour ta participation à ce jury de thèse, nos échanges sur la phagothérapie mais surtout de me transmettre une petite part de ta grande expérience des infections ostéo-articulaires. Je suis très heureuse de pouvoir participer à l'aventure passionnante « phagothérapie aux HCL » dans un bel esprit d'équipe et je suis très impressionnée par les efforts que tu peux accomplir pour trouver des solutions pour ces patients dans des situations très compliquées.

Dr. Claude-Alexandre GUSTAVE

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci également pour ce que tu m'as transmis pendant mon internat à l'IAI. Tu nous quittes pour l'immunologie, mais je suis sûre qu'on sera amenés à retravailler ensemble avec cette nouvelle casquette, qui sait sur la phagothérapie !

Mr. Mathieu MEDINA

Merci pour tout ce que tu m'as appris sur les phages, d'être venu à Lyon pour prendre le temps de me montrer comment prendre soin de ces petites bêtes et de revenir pour ma soutenance de thèse. J'ai particulièrement apprécié de pouvoir échanger régulièrement et en confiance avec toi. Je te remercie pour tes remarques scientifiques sur ce travail, toujours très justes et bien vues. J'espère qu'on aura l'occasion de continuer à travailler ensemble. Merci également à toute l'équipe de Pherecydes pour votre travail dans l'intérêt de nos patients.

A mes collègues

Je remercie tous les **biologistes et techniciens de l'IAI** que je ne peux malheureusement pas tous citer, qui me transmettent au quotidien leurs connaissances de la microbiologie et avec qui je suis ravie de pouvoir continuer à travailler.

Merci également à toutes les équipes des autres laboratoires dans lesquels j'ai eu la chance de travailler pendant mon internat. Je pense particulièrement aux biologistes avec qui j'ai partagé la même vision de notre métier et qui m'ont énormément appris, **Marie-Odile, Laurent, Oriane, Régine, Véronique, Mathilde**.

A tous les membres de la « grande équipe des Staph ».

Merci au **Pr Vandenesch** de m'avoir permis de rejoindre l'équipe et de me soutenir pour la suite.

Un immense merci à mes collègues Croix Roussiens sans qui je n'aurais pas pu apprendre autant de choses depuis mon M2... et la liste est longue !

Alice, Allison, Andréa, William, Youssef, Virginie, Lélia, Marie, Camille, Anaïs, Marine, Silvere, Marina. C'était un plaisir d'échanger tous les jours avec vous en manip mais pas que ! ;)

Jason, ton soutien technique (et psychologique) m'est d'une grande aide, tu sais toujours comment saisir le bon côté des choses et je t'en remercie !

Patricia, merci de toujours mettre la bonne ambiance au travail et surtout d'avoir pris du temps pour m'initier au séquençage. J'ai hâte de continuer avec toi sur ce sujet.

Jérôme et Alan, vous faites un duo de chefs irremplaçable ! Alan, j'ai beaucoup de peine que tu nous quittes car tu m'as énormément apporté scientifiquement et humainement. Mais bon entre le Staph et le foie gras, c'est vrai qu'on n'hésite pas longtemps ... Je ne garderai que des bons souvenirs du travail avec toi et même de nos moments de désespoir devant nos photos de gels de PCR franco-suisses (on a bien ri quand même...). Je te souhaite beaucoup de bonheur à Pau, je suis sûre que l'aura de la mafia toulousaine ira jusque-là ;)

Merci à **Cédric, Florence, Jessica, Laura, Paul** pour votre accueil et aide lors des manips à Laënnec.

Je remercie également particulièrement **Michèle** et les **techniciennes du CNR des Staphylocoques** pour votre gentillesse et votre aide. On peut toujours compter sur vous, c'est précieux !

Christophe, merci pour ton immense culture de la bactério, des manips et des trucs et astuces. Tu es toujours de bons conseils et très pédagogue. C'est un plaisir de te croiser dans les couloirs et de pouvoir t'arrêter pour une question brûlante « séquençage » ou autre.

A ma famille

A mes **parents**, Je ne serais pas en train de soutenir ma thèse sans votre amour et soutien pendant mes études mais également votre volonté de nous faire voyager, de nous pousser vers la curiosité. Même si vous ne comprenez pas toujours pourquoi mes études sont si longues, je sais que je peux toujours compter sur vos encouragements. **Maman**, même si j'ai beaucoup râlé après ton côté « mère poule », tu m'as transmis ta sensibilité, ton sens de l'écoute des autres, ta ténacité à défendre ses valeurs... mais malheureusement pas vraiment ton sens artistique ! **Papa**, merci pour ton esprit scientifique, tes talents de cuisto chef que j'essaie d'imiter mais surtout pour avoir toujours été très présent et attentif, à l'image de tous les trajets retour du dimanche soir pour m'encourager et me donner l'envie de retourner travailler.

A **Mathilde**, ma petite sœur, « c'est moi la grande sœur ! ». Si je t'ai un peu trop couvée à ton goût, sache que je mesure la chance d'avoir partagé mon enfance avec toi. Je suis fière de la belle femme que tu es devenue aujourd'hui, bien plus aventurière, courageuse (sportive, ça va sans dire !) que moi et pleine de belles convictions. Rentre vite !

A mes **grands-parents**, votre amour et bienveillance m'ont aidée à me construire. **Mamy N**, merci de nous avoir comblées d'attentions... tout en nous laissant jouer à la belotte avec les feuilles d'artichaut ! Je n'ai malheureusement pas hérité de ta patience infinie mais j'essaie de m'en inspirer. **Papy J**, merci de t'être battu avec les mamans profs du collège pour avoir tes mercredis et d'avoir fait de notre enfance un jeu perpétuel. Si je deviens un jour enseignante, je sais que ce sera grâce à nos exercices de maths ! **Mamy T**, tu as fait de nous les petits enfants les plus heureux du monde, avec une énergie folle pour nous rassembler pour Noël ou à Merlimont. Ton souvenir, ainsi que celui de Papy, continue à souder notre famille. J'ai également une pensée pour mes arrière grands-parents et arrière-arrière grands parents. Quelle fierté de savoir que cinq générations ont été réunies.

A **Michèle** et **Jean-Pierre**, merci de nous avoir toujours gâtées comme vos petits-enfants.

A mes **oncles** et **tantes**, **cousins** et **cousines**. Même s'ils deviennent de plus en plus rares en grandissant, merci pour les moments précieux en famille que nous partageons ensemble.

A la **famille Condruz**, **Mariana**, je vous remercie de m'avoir acceptée les bras grands ouverts dans votre maison. Je passe toujours de très bons moments à vos côtés. **Mady** et **Gilles**, merci de nous accueillir quand on a besoin d'un bol d'air à la montagne et pour chouchouter vos deux princesses futures mécanos, **Chloé** et **Julie**. **Daniela**, je sais à quel point tu comptes dans cette famille et c'est toujours un plaisir de te voir.

A mes ami(e)s

A mes amies de toujours. Alin, Marin, Candin, Annabelle. La liste des moments qu'on a partagés ensemble pendant nos années folles est longue sur les bancs du collège/lycée, chez nos parents respectifs, à Saussex, Barcelone... Même si nos (mes...) études et boulots font qu'on se voit trop peu souvent, je tiens énormément à nos moments de retrouvailles.

A toute la famille Oullinoise (qui s'agrandit...). Ces années de lycée nous auront permis de former une sacrée bande de copains ! La vie a fait qu'on s'est un peu tous éparpillés mais les week ends entre Sous Marcelly et Dauphin, repas de Noël se passent comme si on avait toujours 15 ans ... avec quelques enfants en plus !

A mes amis pharmaciens

A la dream team... **Caro et Marine**, premières rencontres de la P1, **Sophie**, ma binôme de choc, **Caro** et ton rire si communicatif, **Léa**, ça aurait été tellement bien l'internat ensemble à Lyon, **Jérémy**, **Norbert** et **Mathieu**, heureusement que vous êtes là aussi ! A Marseille, Bordeaux, au ski ou dans le beaujolais, beaucoup de week ends ensemble à venir !

Au bureau du VICE (et ce n'est pas rien de le dire !), **Brice**, **Angélique**, **Maxime**, **Claire**, **Alex**, **Aline** et **Stefan**. Merci de m'avoir acceptée comme « 7 et demi », mes années de fac n'auraient pas été les mêmes sans l'expérience de l'Amicale ! **Philou** et **Ingrid** ont maintenant rejoint l'équipe !

A l'équipe des « jokeurs de Papa », que j'ai appris à connaître ces dernières années avec grand plaisir. **Clément** et **Pauline**, **Damien** et **Quitterie**, **David** et **Chloé**.

Laurent, merci de toujours prendre soin de Stefan quand je suis de garde ! Tes exploits sportifs m'impressionneront toujours ... ainsi que **Coline** et **Vincent**, mes 4 mois avec vous outre-Atlantique m'ont vraiment marquée et j'ai hâte que vous rentriez en France pour reformer l'équipe de choc ! Si le virus du voyage ne vous rattrape pas trop rapidement...

Chloé et **Thomas**, la belle surprise de Montréal... et depuis toujours un plaisir de vous retrouver en Bretagne ou ailleurs !

Merci **Marion** pour ces deux ans de coloc' au top !

Aux zozos lyonnais. Mln et **Céline** (et **Emilie**), **Ogn** et **Maria** (et **Matis**), **Tqt** et **Ikram**, **Mco** et **Cécile**, **Neb**... Quels beaux prénoms les garçons ! Grâce à vous je connais Cdz sous son vrai jour...

A mes cointernes et amis, 5 ans d'internat ça peut paraître long, mais à vos côtés c'était que du plaisir !

Mon premier semestre restera le plus beau... Merci à nos deux niveaux 2, **Dédéééé**, **Miiiiiiich**, pour nous avoir chouchoutés, nous avoir transmis ce que vous saviez avec amour et de nous avoir permis de bien commencer notre internat ! **Astrid** bien sûr, **Miky** qui continue peut être à suivre virtuellement nos conversations What's App sans nous répondre... Grâce à (à cause de?) vous deux ce foutu surnom de « tractopelle » me suit partout... **Caroline** et **Yann**, c'était un plaisir de partager ce semestre avec vous et de comprendre l'importance d'une amitié entre cliniciens et biologistes ... même au prix d'un poignet cassé !

Merci **Astrid** (encore...) et **Mick** (même si tu nous as laissé aucune chance dans le cœur de l'équipe du CBE avec ton sourire de joli cœur... tu les rends tous jaloux !) pour ce trio de choc en biochimie ! On

s'est bien marrés ... et on a un peu travaillé ! On peut quand même se vanter d'avoir contribué à « enfanter » Batman ... Sans oublier **Alice** et **Caroline** bien sûr.

La découverte de la bactério fut intense grâce à vous, **Zoé, Cécile, Vincent, Yann, Carole**. Seule bébé interne parmi vous, j'ai été choyée. On continue la bactério un peu chacun de notre côté !

Astrid (...encore !), heureusement que tu étais là pour ce semestre en immunologie en « petit comité » même si notre bébé **Aubin** nous a ensuite rejoint ! Petite équipe, mais grande efficacité ! (hum hum...)

La liste de mes cointernes de l'IAI est ensuite longue ... ! Les **Camille A, Lamia**, les **Thibault, Thomas, Alexia, Marine, Eugénie, Clément, Rémi, Mélanie, Léa, Jordan, Aubin, Lam Thuy, Marine, Manon, Rémi, Sibyle, Célia, Alexane, Maelle, Floriane, Louis, Grégory**. Il me faudrait quelques pages de cette thèse pour décrire tous les souvenirs qui m'ont marquée à vos côtés, dans le bocal, dans le bureau des internes et autour d'un café... Merci pour ces semestres de niveau 2 qui sont passés à vitesse grand V !

Béa... je ne serais pas là sans toi ! Depuis que tu m'as vendu tes moniteurs de l'internat, tu n'as pas cessé de me chouchouter ! Et j'espère que ça va encore durer :) **David**, surtout merci pour m'avoir laissé ta place à l'internat ! **Estelle**, j'ai particulièrement apprécié nos discussions chez moi (ou chez toi, je ne sais plus... ;)), au SIPHL, autour d'un verre.

Enfin merci à tous ceux avec qui je n'ai pas eu la chance de passer un semestre et avec qui j'ai partagé des gardes ou un mandat au SIPHL, et des bons souvenirs ! **Alexandre, Anatole, Aurélien, Claire, Coline, Lucien, Stéphanie, les Pauline, Thibaut** et tous ceux que j'oublie.

J'aurai forcément un petit mot particulier pour vous trois, merci pour votre enthousiasme et joie de vivre dans les meilleurs moments, votre soutien dans les moins bons.

Astrid, Madaaame la duchesse de Chablis, quel bonheur de t'avoir rencontrée avant même de commencer l'internat ! On se ressemble beaucoup... le soleil et la grâce pour toi en plus (pas qu'à la gym suédoise...) ! Tu t'es expatriée à Bourg... mais tu ne te débarrasseras pas de moi comme ça ! ;)

Pauline, mais pourquoi avoir attendu 5 ans de fac ?! (Bon, j'y suis peut-être un peu pour quelque chose... ;)). J'ai vraiment partagé depuis de supers moments avec toi, dommage qu'on n'ait pas pu passer un semestre ensemble... Je suis sûre que nos (quelques...) années de syndicat feront de nous des biologistes au top, sûres de leurs convictions, Niac, Niac, Niac !

Laurent, d'abord voisins puis cointernes, cosyndicalistes, je suis ravie de pouvoir maintenant te compter dans mes amis. Tu manques à la bactério !

Je crois que nos moitiés complètent à merveille ce quatuor... **Bastien, Edouard, Damien, Stefan**, on peut dire que vous ne manquez pas de folies...

Bien sûr le meilleur pour la fin, **Stefan**, merci pour tout ce que tu m'apportes depuis bientôt huit ans. Même si entre Montréal, Toulouse et bientôt Oxford, on peut dire qu'on n'aime pas se faciliter la vie, ce ne sont que des merveilleux souvenirs qui font que la vie est une évidence à tes côtés. Merci de toujours me soutenir, m'encourager et d'essayer de me transmettre ta patience, ta ténacité, ta sérénité, ta gentillesse, ton sens de la diplomatie (et ton humour, hum hum). Je sais que le meilleur reste à venir. Je t'aime infiniment.

SOMMAIRE

Liste des Figures	15
Liste des Tableaux	16
Liste des Abréviations	17
INTRODUCTION – CONTEXTE DE L’ETUDE	18
REVUE DE LA LITTERATURE	20
PARTIE A : INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES, INFECTIONS COMPLEXES ET DIFFICILES A TRAITER : GENERALITES ET FOCUS SUR LES INFECTIONS A <i>S. AUREUS</i>	
I. Généralités sur les infections ostéo-articulaires.....	21
1) Définition	21
a) Présence de matériel.....	21
b) Mode de contamination.....	22
c) Délai d’évolution	22
2) Epidémiologie des infections ostéo-articulaires	23
a) Epidémiologie en France	23
b) Facteurs de risque	23
c) Epidémiologie microbiologique : pathogènes les plus fréquemment isolés dans les infections ostéo-articulaires	24
II. Physiopathologie: mécanismes favorisant l’évolution chronique des infections ostéo-articulaires à <i>S. aureus</i>	25
1) Formation de biofilm.....	26
2) Internalisation dans les cellules phagocytaires non professionnelles.....	27
3) Formation de <i>Small Colony Variant</i>	28
III.Diagnostic des infections ostéo-articulaires	28
1) Diagnostic clinique	28

2) Diagnostic radiologique.....	28
3) Diagnostic biologique	29
a) Marqueurs biochimiques et cytologiques.....	29
b) Diagnostic microbiologique.....	30
i.Types de prélèvements à réaliser	30
ii. Modalités de l'examen microbiologique	31
iii. Interprétation des résultats microbiologiques.....	32
IV.Prise en charge thérapeutique conventionnelle des infections ostéo-articulaires	
33	
1) Prise en charge chirurgicale	33
2) Traitement médical	35
a) Principes généraux de l'antibiothérapie	35
b) Particularités du traitement des infections à <i>S. aureus</i>	36
3) Particularités des infections ostéo-articulaires complexes et rôle des centres de référence des infections ostéo-articulaires complexes	37
PARTIE B : PHAGOTHERAPIE.....	39
I. Bactériophages-Généralités	39
1) Définition	39
2) Classification et structure.....	39
3) Historique de la phagothérapie	40
a) Découverte des phages et enthousiasme initial pour la phagothérapie	40
b) Remise en question et abandon du développement de la phagothérapie dans les pays occidentaux.....	41
c) Emergence des résistances bactériennes au niveau mondial et regain d'intérêt pour la phagothérapie.....	42
4) Mécanisme d'action des bactériophages.....	43
a) Cycle de réplication	43

i. Cas des bactériophages lytiques	44
ii. Cas des bactériophages tempérés	44
b) Production d'enzymes lytiques par les bactériophages	45
i. Les holines.....	45
ii. Les endolysines	45
II. Intérêt et utilisation des bactériophages en thérapeutique humaine.....	48
1) Antibiotiques et bactériophages	48
a) Avantages des bactériophages par rapport aux antibiotiques	48
b) Association synergique des bactériophages avec les antibiotiques	49
2) Caractérisation de l'activité antibactérienne des bactériophages sur les bactéries planctoniques : réalisation du « phagogramme »	51
a) Technique spot test et calcul du score EOP (<i>Efficiency of plating</i>)	52
b) Etude de la sensibilité aux bactériophages en milieu liquide (<i>Killing assay</i>)	52
c) Corrélation entre sensibilité <i>in vitro</i> et efficacité <i>in vivo</i>	53
3) Evaluation de l'efficacité thérapeutique des bactériophages	53
a) Modèles <i>in vitro</i> : activité sur les bactéries sanctuarisées.....	53
i. Evaluation de l'activité des bactériophages sur le biofilm.....	53
ii. Evaluation de l'activité des phages sur les bactéries intracellulaires.....	56
b) Données précliniques : modèles animaux <i>in vivo</i>	56
c) Evaluation de l'utilisation des bactériophages en thérapeutique humaine.....	58
i. De l'expérience de l'Europe de l'Est aux traitements compassionnels par bactériophages en Europe de l'Ouest.....	58
ii. Essais cliniques.....	62
4) Risque d'émergence de résistances aux bactériophages	65
a) Mécanismes de résistances.....	65
b) Emergence de résistance aux phages dans le cadre de la phagothérapie	66

TRAVAIL PERSONNEL	69
ARTICLE.....	70
DISCUSSION - PERSPECTIVES.....	92
BIBLIOGRAPHIE	97
CONCLUSIONS	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration des trois principaux mécanismes physiopathologiques favorisant l'évolution chronique des infections ostéo-articulaires à <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figure 2 : Etapes de formation et maturation du biofilm	26
Figure 3 : Structure des trois familles de bactériophages appartenant à l'ordre des <i>Caudovirales</i>	40
Figure 4 : Cycle de réplication des bactériophages.....	43
Figure 5 : Structure de la paroi bactérienne et cibles des endolysines	46
Figure 6 : Illustration de l'effet synergique observé par Comeau <i>et al.</i> entre antibiotiques et bactériophages	50
Figure 7 : Illustration des techniques utilisées pour la réalisation du « phagogramme ».....	51
Figure 8 : Préparations de bactériophages produits par l'institut Eliava pour le traitement et la prophylaxie.....	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etudes rapportant l'efficacité de bactériophages en comparaison ou association à des antibiotiques pour le traitement de biofilms dans des modèles in vitro	55
Tableau 2 : Synthèse des articles rapportant l'utilisation de bactériophages produits dans des pays occidentaux pour des traitements « compassionnels »	60
Tableau 3 : Synthèse des essais cliniques randomisés évaluant la sécurité et l'efficacité de la phagothérapie	63

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSM : Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé

Abi : *Abortive infection*

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CRIOAc : Centre de référence des infections ostéo-articulaires complexes

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CRP : Protéine réactive C

DO : Densité optique

EOP : *Efficiency of plating*

FDA : *Food and drug administration*

FnBP : *Fibronectin binding proteins*

HCL : Hospices civils de Lyon

ICTV : *International committee on taxonomy of viruses*

IOA : Infections ostéo-articulaires

IPATH : *Center for innovative phage applications and therapeutics*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LPS : Lipopolysaccharide

MOI : *Multiplicity of infection*

PAS : *Phage-antibiotic synergy*

PFU : *Phage forming-unit*

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SCV : *Small colony variant*

Sie : *Superinfection exclusion*

INTRODUCTION – CONTEXTE DE

L'ETUDE

Les infections ostéo-articulaires (IOA) regroupent des entités cliniques hétérogènes, qui ont en commun l'invasion des tissus osseux et/ou cartilagineux par un microorganisme pathogène, aboutissant à leur destruction progressive. Elles représentent un enjeu majeur de santé publique. En effet, leur incidence et le coût de leur prise en charge sont en augmentation et elles sont responsables d'une morbidité importante (1). Le traitement des IOA associe en général une prise en charge chirurgicale et une antibiothérapie prolongée (2,3).

Staphylococcus aureus est le premier agent responsable des IOA. Cette prévalence est expliquée par l'expression de nombreux facteurs de virulence favorisant l'évolution chronique des infections grâce au développement de mécanismes physiopathologiques par cette bactérie : i) la formation de biofilm, communauté de bactéries adhérant à une surface et se développant au sein d'une matrice extracellulaire qu'elles produisent, et ii) l'internalisation et la persistance dans les ostéoblastes, cellules responsables de la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse (4,5). Ces deux mécanismes limitent l'accessibilité des cellules immunitaires et des antibiotiques à ces formes bactériennes sanctuarisées et donc leur activité, favorisant l'apparition d'échecs thérapeutiques. Par ailleurs, l'augmentation inquiétante des résistances bactériennes ainsi que l'apparition d'effets indésirables et d'allergies aux antibiotiques limitent aussi les choix possibles pour l'antibiothérapie. La combinaison de ces phénomènes entraîne parfois des impasses thérapeutiques. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc nécessaire pour améliorer la prise en charge de ces patients, telle que la phagothérapie.

Les bactériophages sont des virus spécifiques des bactéries, découverts en 1917 par Félix d'Hérelle, microbiologiste franco-canadien, et ont été considérés dès cette période comme une thérapie antimicrobienne prometteuse (6). Cependant, l'avènement des antibiotiques au moment de la deuxième guerre mondiale a entraîné l'abandon de la phagothérapie par les

pays occidentaux, alors qu'elle est restée un traitement très populaire dans les pays d'Europe de l'Est comme la Géorgie, la Pologne et la Russie (7). Elle continue à être utilisée dans ces pays mais sans véritable évaluation scientifique de l'activité clinique ou de la tolérance.

Devant la menace émergente de l'antibio-résistance au cours des dernières décennies, la phagothérapie suscite un regain d'intérêt, notamment pour le traitement des IOA (8). Des patients pris en charge par le Centre de Références des Infections Ostéo-Articulaires complexes (CRIOAc) des Hospices Civils de Lyon (HCL) ont récemment pu bénéficier à titre compassionnel de traitement par des bactériophages produits par la société française Pherecydes Pharma (9,10). Les HCL ont par ailleurs participé au projet de recherche PHOSA porté par cette entreprise entre 2015 et 2018 dont l'objectif central était la sélection de bactériophages lytiques efficaces contre *S. aureus* dans le contexte des IOA. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'activité de l'assemblage des 3 bactériophages anti *S. aureus* sélectionnés lors du projet PHOSA et utilisés aux HCL dans un modèle de biofilm et un modèle d'infection d'ostéoblastes humains.

REVUE DE LA
LITTERATURE

PARTIE A : INFECTIONS OSTEO-ARTICULAIRES, INFECTIONS COMPLEXES ET DIFFICILES A TRAITER : GENERALITES ET FOCUS SUR LES INFECTIONS A *S. AUREUS*

I. Généralités sur les infections ostéo-articulaires

1) Définition

Les infections ostéo-articulaires (IOA) sont définies par une invasion et une destruction progressive des tissus osseux et cartilagineux par un ou plusieurs micro-organismes. Ce terme regroupe des formes cliniques très hétérogènes touchant différentes entités anatomiques : infections de la cavité articulaire (arthrite septique), du tissu osseux cortical et/ou médullaire (ostéite et ostéomyélite), du disque intervertébral et des plateaux vertébraux adjacents (spondylodiscite). Il n'existe pas de classification consensuelle des IOA, qui sont généralement différenciées selon plusieurs critères (2).

a) Présence de matériel

Les infections sur matériel regroupent les infections sur prothèse (majoritairement de hanche et genou) et sur matériel d'ostéosynthèse. La présence matériel est retrouvée dans environ 30% des IOA en France (1). D'après les données du réseau de surveillance français RAISIN, en 2010, le taux d'incidence d'infection était de 0,60 % pour les prothèses totales de hanche, de 1,53 % pour les prothèses partielles de hanche et de 0,34 % pour les prothèses de genou (11).

La présence de matériel augmente le risque d'infection par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la surface de la prothèse est propice à l'adhésion bactérienne et à la formation de biofilm (12). De plus, l'absence de microcirculation au niveau du matériel limite l'afflux des cellules du système immunitaire et la diffusion des antibiotiques. La stimulation des polynucléaires neutrophiles en contact avec la prothèse induit aussi une libération de défensines inhibant localement la phagocytose responsable d'une immunodépression locale (13).

b) Mode de contamination

Les IOA peuvent se développer grâce à trois modes de contamination :

- par inoculation directe : lors d'un geste invasif thérapeutique ou diagnostique, d'une chirurgie, d'un traumatisme lors duquel l'os et/ou son matériel sont exposés à l'air
- par voie hématogène : l'IOA est alors une localisation septique secondaire au cours d'une bactériémie survenant à partir de portes d'entrée variables (urinaire, respiratoire, cutanée, dentaire etc.).
- par contiguïté : l'infection des tissus mous voisins peut se propager à l'os ou à l'articulation à proximité en suivant préférentiellement le système de drainage lymphatique

c) Délai d'évolution

La définition de la chronologie d'évolution est un critère primordial lors du diagnostic d'une IOA car elle est déterminante dans le choix de la prise en charge et l'évolution sous traitement (2,3). Plus le délai entre l'apparition des signes cliniques et la prise en charge est important, plus il sera difficile de l'éradiquer à cause notamment de la formation de biofilm (voir paragraphe II.1.).

Les IOA sont classiquement divisées en deux grands groupes : i) infections aiguës, se manifestant par des signes inflammatoires locaux (douleur, rougeur, œdème) ou généraux (fièvre, syndrome inflammatoire) importants, et ii) infections chroniques, évoluant souvent à bas bruit, sur plusieurs mois, avec un faible syndrome inflammatoire biologique et une fièvre souvent absente. Cependant, la définition du caractère aigu ou chronique des IOA n'est pas consensuelle. Un délai arbitraire de 3 à 4 semaines entre le début des signes cliniques et le diagnostic microbiologique est habituellement retenu.

Pour les IOA sur matériel, en plus du caractère aigu ou chronique, on différencie les infections précoces (moins de 1-3 mois après la pose du matériel), retardées (entre 1-3 mois et 1-2 ans) et tardives (plus de 1-2 ans) (3,14). En effet, le délai entre la pose du matériel et l'infection permet d'orienter sur le mécanisme d'infection du matériel et l'étiologie bactérienne. Les infections précoces ou retardées se développent plutôt suite à l'inoculation per opératoire de bactéries. Plus la bactérie est virulente, plus l'infection aura tendance à se déclarer rapidement (*S. aureus* ou bacilles à Gram négatif dans le cas des infections précoces vs

staphylocoques à coagulase négative dans le cas des infections retardées). Les infections tardives sont le plus souvent d'origine hématogène et sans lien avec la chirurgie.

2) Épidémiologie des infections ostéo-articulaires

a) Épidémiologie en France

L'incidence des IOA est en augmentation dans tous les pays développés à cause du vieillissement de la population, de l'augmentation du nombre d'arthroplasties et donc du nombre d'infections sur prothèse (15). Ces infections représentent un problème majeur de santé publique. En France, une première étude menée en 2008 à partir des registres de la base de données PMSI (Programme de médicalisation des systèmes d'information regroupant les informations sur chaque hospitalisation) a montré que la prévalence globale des IOA était de 54/100 000 habitants (16). Une nouvelle étude publiée en 2018 sur des données de 2013 a montré que cette prévalence avait fortement augmenté (70/100 000 habitants) (1). Si la mortalité des IOA est estimée à environ 5%, ces infections sont associées à un risque de morbidité très important car elles sont responsables de séquelles fonctionnelles dans près de 40% des cas.

L'impact d'une infection sur le coût de prise en charge d'une pose de prothèse est très important. La durée de séjour à l'hôpital après une arthroplastie est deux fois plus longue en cas d'infection de la prothèse (17). Le coût de prise en charge des IOA sur prothèse a été estimé en 2013 à 450 millions d'euros contre 259 millions d'euros en 2008 et le coût moyen de prise en charge d'une infection a augmenté de 2000€ par séjour (1).

b) Facteurs de risque

Les IOA touchent plus les hommes que les femmes (sex ratio en France : 1.6) (1). Les facteurs de risque d'infections de prothèse classiquement décrits dans la littérature sont : l'âge, le diabète, l'obésité, la polyarthrite rhumatoïde, le temps opératoire (> 2.5 h), le tabagisme actif, l'alcoolisme, l'hématome postopératoire, la cirrhose et le traitement anticoagulant préopératoire (2,3,11).

c) *Epidémiologie microbiologique : pathogènes les plus fréquemment isolés dans les IOA*

La prévalence des différents microorganismes responsables des IOA varie selon le type d'infection, la zone anatomique et l'âge des patients. Les cocci à Gram positif sont les principaux pathogènes retrouvés. Le genre *Staphylococcus* est le plus prévalent quel que soit le type d'infection (1,15,16,18–22) et *S. aureus* est la principale espèce isolée. Elle est impliquée dans 30 à 70% des IOA selon les séries. Cette part importante est notamment expliquée par i) le portage nasal fréquent de cette bactérie dans la population générale (23) et ii) le risque de greffe septique ostéo-articulaire important lors d'une bactériémie à *S. aureus* (30 à 40%) (24). La proportion relative des staphylocoques à coagulase négative varie selon le type d'infection et est plus importante en cas d'infection sur prothèse (jusqu'à 40-50% selon les études) (15,21,22). Les bactéries du genre *Streptococcus* sont retrouvées dans 10 à 20% des cas. Les bactéries à Gram négatif (entérobactéries et *P. aeruginosa*) sont impliquées dans environ 10% des IOA. La part des bactéries anaérobies est globalement faible (< 1%) mais leur prévalence est bien plus élevée si on considère uniquement les infections sur prothèse (20%) avec une forte part d'infections à *Cutibacterium acnes* (15,16,21,22). Les IOA fongiques sont, elles, beaucoup plus rares (moins de 1% des cas) (16,21). Les IOA sont polymicrobiennes dans 10 à 15% des cas, notamment en cas de présence de matériel.

Enfin, une étude récente du Centre de Référence des IOA complexes (CRIOAc) de Lyon a montré que l'écologie des IOA sur prothèse dépendait du délai d'apparition de l'infection après la pose du matériel avec une diminution de la part des entérobactéries avec le temps (17.2% dans la première année vs 3.8% après un an) alors que la prévalence des bactéries anaérobies augmentait (13.5% vs 21.9%) (22).

II. Physiopathologie : mécanismes favorisant l'évolution chronique des infections ostéo-articulaires à *S. aureus*

L'évolution chronique des IOA à *S. aureus* a été associée au développement de phénotypes bactériens permettant l'adaptation à l'environnement osseux, un échappement au système immunitaire de l'hôte ainsi qu'à l'action des antibiotiques. Ces différents mécanismes contribuent à la formation d'un réservoir bactérien résiduel propice aux rechutes (Figure 1).

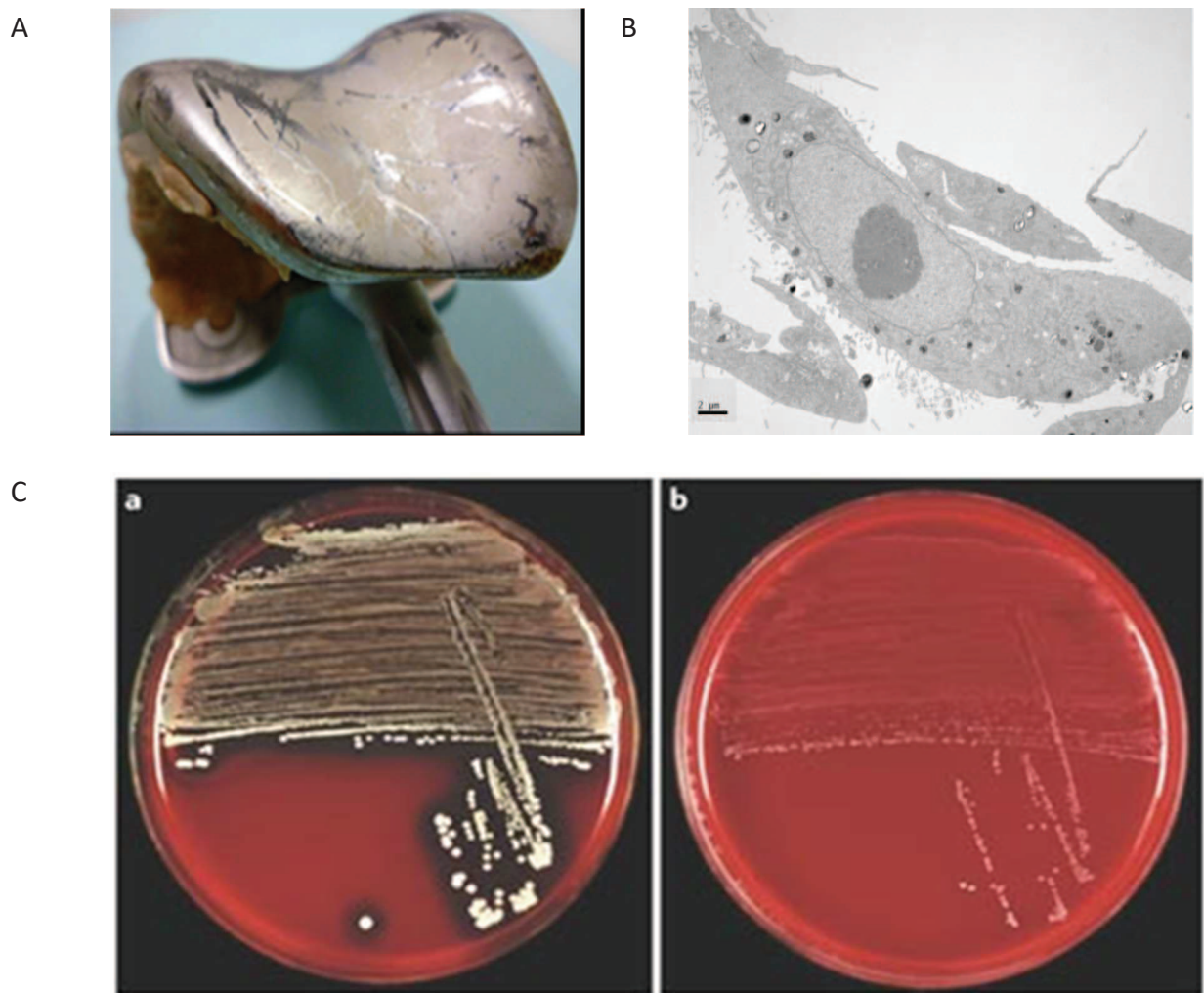


Figure 1 : Illustration des trois principaux mécanismes physiopathologiques favorisant l'évolution chronique des infections ostéo-articulaires à *Staphylococcus aureus*

A : Formation de biofilm sur une prothèse (photo : Pr. F. Laurent)

B : Internalisation de *Staphylococcus aureus* au sein d'ostéoblastes (photo : Dr C. Dupieux)

C : Formation de *Small Colony Variant* ; a : phénotype initial, b : phénotype SCV (d'après (25))

1) Formation de biofilm (Figure 1A)

Le biofilm est composé d'une communauté de bactéries adhérant à une surface et se développant au sein d'une matrice extracellulaire qu'elles produisent (26). Cette dernière est constituée d'exopolysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire. La formation du biofilm est un processus dynamique qui comporte schématiquement 4 étapes (Figure 2) : i) l'adhésion de bactéries planctoniques à une surface, ii) la multiplication bactérienne et formation de « microcolonies », iii) la maturation et le développement du biofilm et iv) le détachement d'une partie du biofilm et colonisation d'une autre surface, à proximité ou à distance. Le biofilm constitue une barrière à l'action des cellules immunitaires (inaccessibilité physique des bactéries) et des antibiotiques (défaut de pénétration, séquestration des molécules, dégradation enzymatique au sein du biofilm, faible activité sur des bactéries au métabolisme réduit) (27).

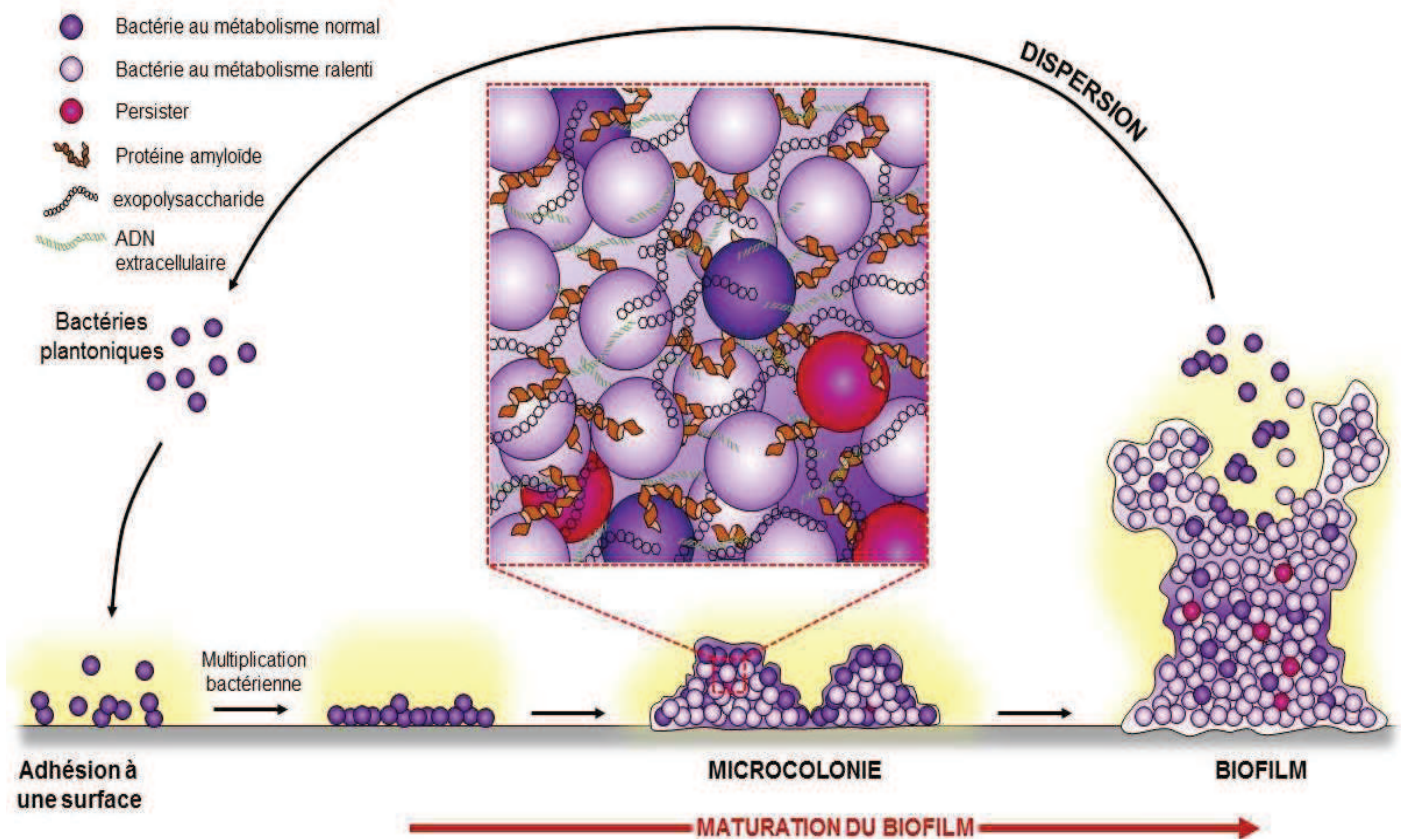


Figure 2 : Etapes de formation et maturation du biofilm (d'après Dr J. Josse)

Dans le contexte des IOA, la pose de matériel est très propice à la formation de biofilm. En effet, les bactéries ont la capacité d'adhérer aux différents matériaux utilisés en chirurgie orthopédique (comme le titane, l'inox, le polyéthylène) (12). De plus, la destruction locale des tissus et l'inflammation générée suite à l'opération, entraîne une augmentation de la production des protéines extracellulaires de matrice de l'hôte (fibrinogène, collagène) et leur dépôt sur la surface prothétique, ce qui facilite l'adhésion bactérienne (28).

2) Internalisation dans les cellules phagocytaires non professionnelles (Figure 1B)

Longtemps considéré comme une bactérie extracellulaire, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que *S. aureus* peut être internalisé puis persister dans divers types de cellules phagocytaires non professionnelles comme les ostéoblastes, cellules responsables de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse (29,30). Ce processus bactérien passif implique un mécanisme cellulaire actif apparenté à la phagocytose, nécessitant l'adhésion de *S. aureus* aux cellules. Les protéines bactériennes permettant la liaison à la fibronectine (FnBP pour *Fibronectin Binding Proteins*) se fixent sur des protéines membranaires cellulaires, les intégrines $\alpha_5\beta_1$, par l'intermédiaire de la fibronectine déclenchant alors l'invagination de la membrane cellulaire et l'internalisation du staphylocoque au sein d'une vacuole suite au remodelage du cytosquelette d'actine (5,31). *S. aureus* peut alors persister dans le compartiment intracellulaire selon plusieurs mécanismes. Tout d'abord, l'activation d'une voie de réponse au stress médiée par le gène *rsbU* stimulant la synthèse d'un agent antioxydatif, la staphyloxanthine, permet de résister à la diminution du pH et l'augmentation du stress oxydant suite à la fusion de la vacuole/phagosome avec un lysosome (32). Par ailleurs, *S. aureus* est capable de s'échapper du phagosome grâce à la production de différentes toxines et de persister dans le cytoplasme (5). Enfin, il peut résister au processus d'autophagie (mécanisme lysosomal de dégradation des constituants cellulaires servant à réguler l'homéostasie cellulaire et permettant en cas d'infection de se défendre contre les pathogènes intracellulaires grâce à la formation d'un autophagosome) et est capable de se multiplier au sein de l'autophagosome (33).

3) Formation de *small colony variant* (Figure 1C)

Les *small colony variant* (SCV) constituent une évolution phénotypique, le plus souvent réversible, résultant de l'adaptation des populations bactériennes à des conditions de stress. Ce phénotype est caractérisé par une croissance ralentie aboutissant à la formation de très petites colonies (environ 10 fois plus petites que le phénotype sauvage), ainsi qu'une sensibilité moindre à certains antibiotiques (34). Leur émergence pourrait être induite par l'internalisation dans les ostéoblastes, le développement au sein du biofilm et l'utilisation de certains antibiotiques comme la gentamicine (35,36).

III. Diagnostic des infections ostéo-articulaires

La précocité du diagnostic des IOA est primordiale pour optimiser les chances de succès lors de leur prise en charge initiale. Malheureusement, la grande variabilité, le manque à la fois de spécificité et de sensibilité des signes cliniques et biologiques peuvent rendre ce diagnostic difficile. Il doit être le fruit d'une réflexion pluridisciplinaire et repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

1) Diagnostic clinique

Les signes cliniques généralement retrouvés dans les IOA sont la fièvre, des signes inflammatoires locaux et des douleurs ostéo-articulaires avec raideur et impotence fonctionnelle. Ils sont bruyants dans le cas des infections aiguës. Dans les cas des infections chroniques, ces manifestations cliniques peuvent être frustrées voire absentes ou évoluer très lentement rendant le diagnostic plus difficile.

Suite à une chirurgie, l'apparition d'une fièvre ou de frissons, d'un épanchement articulaire douloureux, d'une réapparition ou aggravation de la douleur locale ainsi que d'une anomalie au niveau de la cicatrice (désunion, écoulement par la cicatrice, retard de cicatrisation) sont des signes devant faire suspecter une infection précoce (11). L'apparition d'une fistulisation du foyer infecté à la peau ou d'un abcès signent la présence d'une IOA chronique (2).

2) Diagnostic radiologique

Grâce à sa simplicité de réalisation et son faible coût, l'examen radiologique de première intention est la radiographie standard et fait systématiquement partie du bilan. Elle permet principalement de mettre en évidence un séquestre osseux, des appositions périostées, un

descellement de matériel (liseré clair), des zones d'ostéolyse. Cependant, la sensibilité de cet examen dans les formes aiguës est faible car les signes radiologiques apparaissent en général après deux à trois semaines d'évolution. La radiographie est également utile pour le suivi de l'évolution sous traitement.

Le scanner permet de visualiser avec une meilleure résolution que la radiographie les appositions périostées, la lyse osseuse, les lésions articulaires et des tissus mous adjacents. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est actuellement l'examen de référence pour le diagnostic des IOA. Il permet d'explorer les lésions des tissus mous et de visualiser l'œdème osseux. Cependant, la présence de matériel prothétique métallique est à l'origine d'artefacts lors de l'IRM. Le scanner est alors plus adapté (37).

Des examens complémentaires d'imagerie nucléaire peuvent aussi être réalisés. La scintigraphie osseuse aux diphosphonates marqués au technétium 99m a une excellente sensibilité mais présente une spécificité moyenne car des foyers d'hyperfixation peuvent être observés en cas de remaniements osseux d'origine aseptique (fracture, descellement aseptique, chirurgie récente) (38). Au contraire, la scintigraphie aux leucocytes marqués présente une bonne spécificité (38,39). Ces deux examens sont donc souvent combinés.

3) Diagnostic biologique

a) Marqueurs biochimiques et cytologiques

Les marqueurs sanguins d'un syndrome inflammatoire font partie du bilan systématique en cas de suspicion d'une IOA. Cependant, la recherche d'une hyperleucocytose n'est pas un bon marqueur car elle possède une faible sensibilité (40). Il n'y a par ailleurs pas de seuil d'interprétation de la CRP clairement validé dans la littérature et l'interprétation dépend de la présence d'une prothèse et du type d'articulation considéré (41). En pratique clinique, la cinétique d'évolution de la CRP est plus importante que sa valeur absolue. Après une chirurgie, la CRP peut être élevée en l'absence d'infection mais doit se normaliser rapidement. Sa ré ascension doit faire évoquer une infection post-opératoire précoce (42).

L'analyse cytologique du liquide articulaire est recommandée en cas de suspicion d'arthrite septique. L'interprétation du nombre de globules blancs et du pourcentage de polynucléaires neutrophiles dépend de la présence d'une prothèse articulaire (nombre de globules blancs en

faveur d'une infection si supérieur à 50 000 cellules/ μ L dans le cas d'une arthrite septique sur articulation native ou à 1 700 cellules/ μ L en cas d'infection d'une prothèse de genou) (3).

Le dosage d'autres marqueurs dans le sang et/ou liquide articulaire a été proposé dans la littérature (comme le dosage de l'interleukine-6 ou de l'alpha-défensine) mais ne sont pas utilisés en pratique pour l'instant à cause de leur coût, du manque de seuils d'interprétation validés et de l'absence de critères clairs d'utilisation en fonction des contextes cliniques (43,44).

b) Diagnostic microbiologique

Les prélèvements microbiologiques sont indispensables pour confirmer l'infection, identifier le(s) microorganisme(s) responsables et adapter l'antibiothérapie grâce à la réalisation de l'antibiogramme. Le diagnostic microbiologique est rendu difficile par le fait que les bactéries incriminées i) peuvent appartenir à la flore commensale cutanéomuqueuse (risque de contamination lors du prélèvement ou de sa manipulation au laboratoire), ii) peuvent avoir une croissance lente et/ou difficile, iii) sont parfois en faible quantité dans le prélèvement ou piégées au sein du biofilm et des cellules.

i. Types de prélèvements à réaliser

La qualité des prélèvements est un point essentiel du diagnostic des IOA. Les prélèvements de choix pour le diagnostic des IOA sont les prélèvements peropératoires (pus, liquide articulaire, tissu osseux, tissu d'interposition). Ils ont l'avantage d'être profonds et réalisés dans des conditions d'asepsie chirurgicale, ce qui permet de limiter le risque d'isolement de bactéries contaminantes. Ces prélèvements doivent être réalisés si possible après 15 jours d'arrêt de toute antibiothérapie (fenêtre thérapeutique) si l'état du patient le permet et avant toute antibioprophylaxie chirurgicale afin de diminuer le risque d'obtenir des prélèvements faussement négatifs. Il est recommandé de réaliser 5 prélèvements (au minimum 3) dans des zones différentes et si possible macroscopiquement pathologiques pour augmenter la sensibilité de cet examen et faciliter l'interprétation des résultats (discrimination entre une contamination ou une réelle infection par des bactéries de la flore commensale cutanéomuqueuse) (45).

Une ponction de liquide articulaire peut être effectuée en préopératoire pour les diagnostics d'arthrite septique, surtout si l'état clinique du patient nécessite l'instauration d'une

antibiothérapie en urgence avant la prise en charge chirurgicale risquant de négativer les prélèvements peropératoires. L'inoculation de ce liquide articulaire dans des flacons d'hémocultures permet d'augmenter la sensibilité de la détection des bactéries (46).

Les prélèvements superficiels (escarres, fistules, plaies ouvertes) réalisés en pré-opératoire sont à proscrire car le risque de contamination est trop important et ils ne donnent pas dans la majorité des cas des résultats concordants avec ceux des prélèvements profonds (47).

Enfin, des hémocultures méritent d'être réalisées en cas d'IOA aiguë ou de fièvre associée à une suspicion d'IOA. La positivité de ces hémocultures est un argument supplémentaire pour le diagnostic lorsque les prélèvements ostéo-articulaires sont stériles ou dans le cas où les résultats sont difficiles à interpréter.

ii. Modalités de l'examen microbiologique (45)

Les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire car le transport est une étape pré-analytique déterminante pour la qualité du résultat. Ils doivent ensuite être manipulés en condition d'asepsie stricte (hotte à flux laminaire, gants et matériel stériles changés dès que nécessaire).

Les prélèvements solides doivent être broyés (de préférence grâce à des poudriers à billes) afin de libérer les bactéries du biofilm ou de la matrice osseuse. Un examen direct doit être réalisé afin de réaliser une évaluation semi-quantitative des polynucléaires neutrophiles et rechercher la présence de bactéries grâce à la coloration de Gram, même si la sensibilité est très faible (6 à 30% en fonction du recrutement), car la spécificité est excellente.

Les liquides et broyats sont ensemencés sur des milieux riches (gélose au sang et au sang cuit, milieux liquides type Schaedler ou bouillon cœur-cervelle) incubés sous différentes atmosphères (CO₂, anaérobie) au minimum 14 jours afin d'assurer la détection des bactéries au métabolisme ralenti. Une identification et un antibiogramme doivent être réalisés sur tous les aspects de colonies isolées notamment pour les staphylocoques car on peut observer plusieurs phénotypes de résistance pour une même espèce bactérienne chez un même patient. En cas de forte suspicion clinique d'IOA et de négativité de la culture des prélèvements, des approches moléculaires (PCR universelle ciblant l'ADN ribosomal 16S ou

PCR spécifique) pourront être utilisées. Cependant, la sensibilité de la PCR universelle reste imparfaite (75%) (48).

iii. Interprétation des résultats microbiologiques

L'interprétation biologique des résultats dépend du contexte clinique, de la ou les espèces identifiées, de la nature et du nombre de prélèvements positifs, du nombre et milieux positifs pour un même prélèvement et du délai de positivité. Il n'y a pas de consensus pour l'interprétation des résultats microbiologiques mais les critères les plus classiquement retenus pour retenir le diagnostic d'IOA sont (45) :

- Présence d'un prélèvement profond positif avec une bactérie n'appartenant pas à la flore cutanée (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, entérobactéries, *S. pneumoniae* etc.),
- Présence d'au moins 3 prélèvements per-opératoires ou 2 prélèvements espacés dans le temps positifs à la même bactérie (même espèce et même antibiogramme) appartenant à la flore cutanée et pour laquelle l'isolement pourrait être associé à une contamination (staphylocoques à coagulase négative, *Cutibacterium acnes*, corynébactéries etc.)

En parallèle des prélèvements bactériologiques, il est aussi recommandé de réaliser un examen anatomopathologique pour orienter le diagnostic vers une origine bactérienne (infiltration de neutrophiles), fongique (levure, filaments) ou mycobactérienne (granulomes épithélioïdes).

IV. Prise en charge thérapeutique conventionnelle des infections ostéo-articulaires

La prise en charge thérapeutique des IOA doit être multidisciplinaire et décidée en concertation entre infectiologues, chirurgiens et microbiologistes dans le but de pouvoir personnaliser le traitement et proposer la meilleure stratégie médico-chirurgicale permettant de limiter le risque d'échec ou de séquelles fonctionnelles.

1) Prise en charge chirurgicale

La prise en charge chirurgicale des IOA est primordiale et a pour but de réduire au maximum l'inoculum bactérien en éliminant les tissus infectés, nécrotiques et les séquestres osseux et en ne laissant que les tissus bien vascularisés dans lesquels les antibiotiques pourront diffuser. Les techniques chirurgicales utilisables pour le traitement des IOA sont nombreuses et leur choix dépendra essentiellement de la présence ou non de matériel et le délai d'évolution des symptômes.

Des ponctions itératives ou un lavage articulaire chirurgical peuvent être proposés en cas d'arthrite septique sur articulation native (49). Une prise en charge avec une stratégie conservatrice (lavage articulaire avec un large débridement : synovectomie-lavage incluant l'exérèse de la néo-capsule, la néo-synoviale, le changement des pièces mobiles de la prothèse et le maintien du reste du matériel) peut également être adoptée pour les infections survenant sur matériel dans le mois suivant la chirurgie et en l'absence de descellement de la prothèse (11).

Au-delà de 4 semaines, on considère que le biofilm est trop développé pour espérer une éradication de l'infection avec une arthrotomie-lavage et une antibiothérapie. Dans ce cas, le changement du matériel est nécessaire. L'approche peut alors se faire de deux manières :

- Procédure en deux temps

C'est la procédure actuellement recommandée (3). Elle consiste à éliminer lors d'une première opération le matériel et les tissus infectés. L'articulation est alors laissée sans matériel, l'utilisation d'un « espaceur » permettant de préserver la fonction motrice de l'articulation et d'éviter la rétractation des tissus avant la mise en place d'un nouveau matériel, avec des

ciments imprégnés par des antibiotiques afin d'obtenir une antibiothérapie locale (50). La réimplantation d'une nouvelle prothèse se fait lors d'une seconde chirurgie, après plusieurs semaines à plusieurs mois. Lors d'une chirurgie en « deux temps court », elle se fait 4 à 6 semaines après la dépose, avant l'arrêt des antibiotiques. Pour une stratégie « 2 temps long », une fenêtre thérapeutique de 15 jours est réalisée avant la réimplantation, en général 3 mois après la dépose et une antibiothérapie probabiliste est alors réinstaurée après la chirurgie. Dans les deux cas, la stérilité des prélèvements peropératoires réalisés lors de l'opération de réimplantation de la prothèse permet d'arrêter les antibiotiques.

- Procédure en un temps

L'excision de tous les éléments prothétiques et osseux infectés se fait avant implantation dans le même temps chirurgical d'une nouvelle prothèse avec un ciment contenant des antibiotiques suivi d'une antibiothérapie. Cette stratégie est principalement indiquée pour traiter certaines infections de prothèse de hanche (débridement important possible) (3). Elle peut être envisagée pour les patients fragiles ne pouvant pas subir plusieurs chirurgies, si le geste chirurgical à réaliser n'est pas compliqué, si la documentation bactériologique est certaine avant la chirurgie et la bactérie est facile à traiter (absence de bactéries multi résistantes aux antibiotiques couramment utilisés, de *P. aeruginosa*, de mycobactéries ou de champignons), en l'absence d'antécédents d'IOA ou de problèmes de couverture cutanée (2). Les principaux intérêts de ce type de chirurgie sont un meilleur score de qualité de vie pour le patient et coût de prise en charge plus réduit (51).

Le changement de la prothèse est réalisé en un temps plutôt qu'en deux temps à une fréquence très variable selon les centres et il n'existe malheureusement pas de consensus sur le type de chirurgie à privilégier. Les données disponibles dans la littérature sont issues principalement d'études monocentriques non comparatives. La méta analyse de Kunutsor *et al.* n'a pas montré de différences significatives entre les pourcentages de réinfection suite à la prise en charge d'une infection de prothèse de genou en 1 ou 2 temps (52). Cependant, les groupes de patients des cohortes de chirurgies réalisées en un temps sont probablement sélectionnés différemment de ceux des études avec des changements en 2 temps, ce qui entraîne des biais d'interprétation importants.

2) Traitement médical

a) Principes généraux de l'antibiothérapie

Une antibiothérapie probabiliste est instaurée en postopératoire immédiat après la réalisation des prélèvements (ciblant en général à la fois les bacilles à Gram négatif et les cocci à Gram positif) et est réadaptée avec les résultats des examens microbiologiques. Dans la phase initiale, il est actuellement recommandé d'administrer les antibiotiques par voie intraveineuse (au minimum pendant 2 semaines) pour obtenir des concentrations plasmatiques élevées avant d'envisager un relai par voie orale (2). Cependant, un essai clinique récent multicentrique randomisé publié dans le *New England Journal of Medicine* suggère que l'administration *per os* très précoce (moins de 7 jours après le début des antibiotiques) permettrait d'obtenir des résultats équivalents à une antibiothérapie intraveineuse de 6 semaines (53). Des antibiotiques utilisés en bithérapie, bactéricides, présentant une bonne diffusion osseuse et actifs sur le biofilm sont à privilégier. La durée de l'antibiothérapie est variable selon l'indication (6 semaines à 3 mois) (2).

L'antibiothérapie prolongée pouvant entraîner l'apparition de nombreux effets indésirables, une surveillance clinique (tolérance digestive, allergie) et biologique (hémogramme, bilan hépatique et rénal) rapprochée est nécessaire. Les interactions médicamenteuses peuvent être nombreuses notamment en cas d'utilisation de rifampicine (inducteur enzymatique du cytochrome P450). Un dosage sanguin des antibiotiques est souvent nécessaire pour s'assurer de l'obtention de concentrations sanguines efficaces et de l'absence de surdosage.

En cas d'infections chroniques pour lesquelles une prise en charge chirurgicale adaptée est impossible car associée à un pronostic fonctionnel trop mauvais ou à un risque opératoire et anesthésique trop important, une antibiothérapie suppressive pourra être indiquée dans le but d'inhiber la réplication bactérienne autour de la prothèse, de limiter le risque de gêne fonctionnelle et de sepsis. Elle consiste à la prise quotidienne d'antibiotiques en général en monothérapie par voie orale (2). L'antibiotique choisi doit avoir un bon profil de tolérance et il faut pouvoir s'assurer de l'observance de ce traitement par le patient. Il n'y a cependant pas de consensus sur les indications précises, le choix des antibiotiques et la durée de cette antibiothérapie suppressive.

*b) Particularités du traitement des infections à *S. aureus**

Les antibiotiques utilisés en première intention dans la phase initiale du traitement par voie intraveineuse d'une IOA à staphylocoque sont les β -lactamines (pénicilline M ou cefazoline) en cas de sensibilité à la méticilline (SASM) ou les glycopeptides (vancomycine ou teicoplanine) en cas de résistance à la méticilline (SARM). Ces deux classes d'antibiotiques ayant une faible capacité de diffusion dans l'os, ils sont utilisés à forte posologie, exposant à un risque majoré d'effets indésirables (54).

La rifampicine a un rôle majeur dans le traitement des IOA à staphylocoque car elle a une bonne biodisponibilité et excellente diffusion osseuse, associée à une bonne activité contre les staphylocoques intracellulaires et antibiofilm (54–56). Cependant, il s'agit d'un antibiotique qui doit être utilisé avec précaution car le risque d'émergence rapide de résistances est important. La rifampicine est classiquement introduite de manière différée par rapport aux autres antibiotiques, afin qu'elle ne se retrouve pas en monothérapie au début du traitement dans certains tissus où elle aurait diffusé plus rapidement que l'antibiotique associé. Elle est toujours prescrite en bithérapie afin de limiter le risque de sélection de mutants résistants. Lors du relai oral, il est recommandé d'utiliser une bithérapie contenant si possible de la rifampicine accompagnée en première intention d'une fluoroquinolone (excellente biodisponibilité, action sur les bactéries intracellulaires et le biofilm) ou en deuxième intention (en cas d'allergie ou de résistance aux fluoroquinolones) par le cotrimoxazole, la doxycycline ou la clindamycine (2).

Par ailleurs, les IOA à staphylocoque sont des pathologies nécessitant parfois la prescription d'antibiotiques hors AMM, comme la daptomycine et le linézolide, du fait de leur spectre d'activité, leur profil de tolérance et/ou leur activité antibiofilm. La daptomycine est un lipopeptide cyclique bactéricide qui dispose d'une AMM dans le traitement des infections compliquées de la peau et des tissus mous, des bactériémies et endocardites du cœur droit à *S. aureus*. Dans le contexte des IOA, elle est utilisée principalement en alternative aux glycopeptides, notamment en cas d'insuffisance rénale. Cet antibiotique pénètre rapidement dans le biofilm et serait intéressant en association avec la rifampicine (57,58). En raison d'une faible pénétration dans le tissu osseux, les données de la littérature supportent sa prescription à des doses supérieures à celles utilisées pour les autres indications (> 6 mg/kg/jour) (59,60). Le linézolide est un antibiotique bactériostatique qui possède une

AMM dans le traitement des pneumonies et infections de la peau et des tissus mous à bactéries à Gram positif. Il présente l'avantage d'avoir une excellente biodisponibilité orale. Cependant, sa toxicité hématologique en cas de traitement prolongé limite ses indications dans le traitement des IOA (61–63).

Enfin, les molécules utilisables pour l'antibiothérapie suppressive des IOA à staphylocoques sont les céphalosporines orales en priorité (cefalexine ou cefadroxil) ou clindamycine, amoxicilline-acide clavulanique pour les infections SASM et cotrimoxazole, doxycycline pour les infections à SARM. L'utilisation de la rifampicine en monothérapie n'est pas recommandée (3).

3) Particularités des infections ostéo-articulaires complexes et rôle des centres de référence régionaux des infections ostéo-articulaires complexes

Dans le but d'améliorer l'orientation et le traitement des patients atteints d'IOA, la Direction Générale de l'Offre de Soins a créé en 2008 un réseau constitué aujourd'hui de 9 centres de référence régionaux des IOA complexes (CRIOAc) et de 21 centres correspondants. Ces centres ont pour missions de répondre aux demandes d'avis, de prendre en charge des IOA complexes et d'organiser des réunions de concertation pluridisciplinaires (RCP) (64). Les IOA complexes sont définies par le Ministère de la santé selon les critères suivants :

- Le statut du patient : la présence de sévères comorbidités limitant le programme thérapeutique ou une (des) allergie(s) aux antibiotiques,
- Le caractère difficile à traiter du microorganisme isolé (résistance aux antibiotiques ou microorganisme nécessitant un traitement prolongé),
- La nécessité d'une prise en charge chirurgicale particulière pour réaliser une reconstruction osseuse et/ou des tissus mous,
- Une rechute

Les missions spécifiques des CRIOAc sont d'évaluer les pratiques, de participer à la rédaction des recommandations, de promouvoir la recherche et d'assurer de l'enseignement à l'échelle régionale et nationale dans le domaine des IOA. Le réseau des CRIOAc utilise un site national dédié pour la collecte des données épidémiologiques, cliniques, microbiologiques et thérapeutiques des IOA. Entre 2012 et 2017, près de 20 000 patients ont été pris en charge

dans le cadre du réseau des CRIOAc. Leurs dossiers ont été discutés pour la moitié des patients en RCP au moins 2 fois. Si ce réseau a un coût pour la Direction Générale de La Santé (budget annuel de 150 000€ par an par CRIOAc), il permet de développer des centres possédant une expertise très importante dans le but d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'IOA, et au final induire des économies importantes (65).

PARTIE B : PHAGOTHERAPIE

I. Bactériophages-Généralités

1) Définition

Les bactériophages sont des virus infectant naturellement les bactéries avec une grande spécificité. Ils constituent l'entité biologique la plus répandue dans la nature, notamment dans les milieux aquatiques. Un litre d'eau de mer contient environ 10^{10} particules virales et le nombre de bactériophages sur Terre est estimé à 10^{30} (66). Les phages sont également retrouvés en grandes quantités au sein des microbiotes humains. L'intestin contient environ $5 \cdot 10^9$ phages par gramme de selles (67).

Ils ont un impact écologique majeur car ils participent au contrôle des populations bactériennes, au transfert d'informations génétiques entre bactéries et aux cycles d'éléments comme le carbone, l'azote et le phosphore (68,69).

2) Classification et structure

Les bactériophages présentent une grande diversité. On estime qu'il existe entre 100 000 et plusieurs millions d'espèces de bactériophages différents (70). Les premières classifications reposaient sur leur taille, leur spectre d'hôte et leur résistance aux agents physico-chimiques et plus tard sur leur morphologie, étudiée par microscopie électronique (71,72). En 1967, Bradley a proposé une classification comportant six types de bactériophages sur la base de: la présence ou l'absence et taille de la queue, la contractilité de la gaine, l'aspect de la capside et le type d'acides nucléiques (de type ADN ou ARN, simple brin ou double brin, qui varie de 3,5 kb et 500 kb) (73). La classification actuellement retenue par l'ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses) est toujours basée sur les différences de morphologies et de composition de l'acide nucléique et comprend 14 familles (74). Les phages les plus représentés appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* (96% des phages) correspondant à ceux possédant une tête et une queue et comprenant les familles des *Myoviridae* (queue longue, droite et contractile), des *Siphoviridae* (queue longue et non contractile), des *Podoviridae* (queue courte et rigide) (75). Les phages ont une taille comprise entre 60 et 300 nm. Leurs différentes structures sont illustrées dans la Figure 3 avec l'exemple du phage T4 (un des

phages les plus étudiés en laboratoire et appartenant à la famille *Myoviridae*), des phages T5 et lambda (famille *Siphoviridae*) et du phage T7 (famille *Podoviridae*).

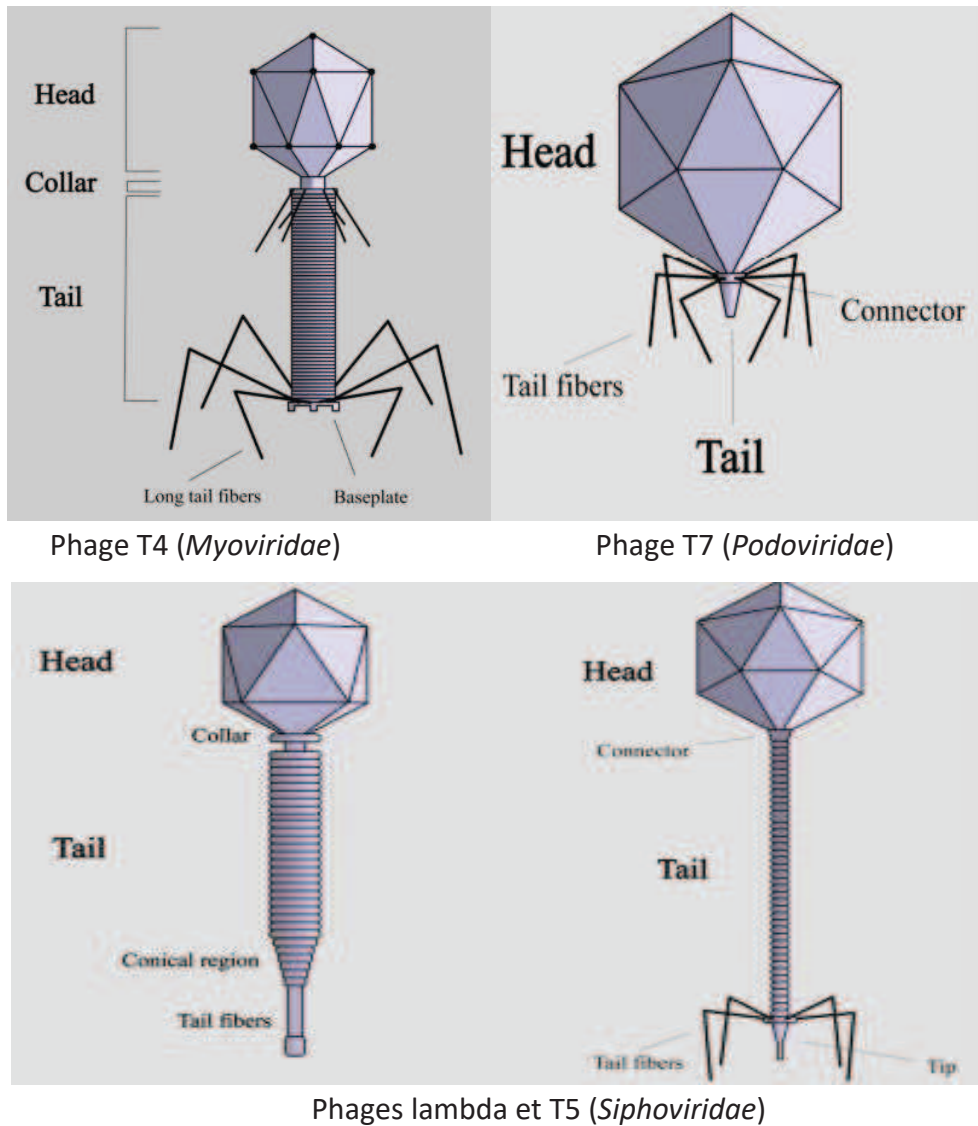


Figure 3 : Structure des trois familles de bactériophages appartenant à l'ordre des *Caudovirales* (d'après Novik *et al.* (76))

3) Historique de la phagothérapie

a) Découverte des bactériophages et enthousiasme initial pour la phagothérapie

L'histoire de la découverte des bactériophages s'est étalée sur deux décennies (77). Les premières observations remontent à la fin du 19^{ème} siècle. En 1986, Ernest Hankin a rapporté

la présence d'une activité antibactérienne importante de l'eau du Ganges et de la Yamuna en Inde envers *Vibrio cholerae* (78). Cependant, la nature de l'agent responsable de cette activité, filtrable et sensible à la chaleur, n'a pas été identifiée à l'époque. Le microbiologiste anglais Frederick Twort a ensuite décrit un phénomène similaire 20 ans plus tard en émettant l'hypothèse qu'il pouvait être lié à un agent de nature virale (79). A la même période, Félix d'Hérelle, microbiologiste franco-canadien, a isolé dans des filtrats de selles de patients atteints de dysenterie des « microbes invisibles » ayant un effet antibactérien, qu'il a appelés plus tard bactériophages (6). La découverte des bactériophages lui est attribuée. Il a montré que la quantité de phages augmentait durant l'infection et atteignait un pic au moment de la guérison. Il a ensuite mené les premiers essais de phagothérapie chez l'animal pour prévenir l'infection à *Salmonella gallinarum* chez le poulet et à *Shigella dysenteriae* chez le lapin. Fort des résultats montrant que l'administration de phages permettait de réduire la mortalité des animaux et la durée des épidémies, il a poursuivi ses investigations et initié l'administration de phages chez l'Homme dans les années 1920 en testant l'innocuité de suspensions de phages sur lui-même et ses collègues puis en l'administrant avec succès à des patients atteints de « dysenterie bacillaire » ou du choléra (80). Ces travaux n'ayant pas été publiés immédiatement, le premier rapport d'utilisation de bactériophages chez l'Homme date de 1921 par Richard Bruynoghe et Joseph Maisin pour traiter des infections cutanées à staphylocoque (81).

b) Remise en question et abandon du développement de la phagothérapie dans les pays occidentaux

Malgré ces premiers succès de l'utilisation des phages en thérapeutique humaine et la commercialisation de formulations développées par le laboratoire de Félix d'Hérelle à Paris ou la société Eli Lilly aux Etats Unis, la phagothérapie fut l'objet de critiques dans les années 1930. Le conseil de la Pharmacie et de la Chimie Américain a émis un rapport soulevant le problème du manque de connaissances sur la nature biologique des bactériophages, l'absence de standardisation de leur préparation et de critères de purification, rendant impossible la comparaison des différentes études entre elles (82). La seconde guerre mondiale et la commercialisation des premiers antibiotiques ont entraîné un déclin de l'intérêt porté aux phages et un abandon des recherches pour répondre aux problématiques soulevées dans ce rapport. En effet, contrairement aux phages, les antibiotiques avaient l'avantage d'être faciles

à produire, stables durant le processus de production et d'avoir un large spectre d'activité. Felix d'Hérelle était assigné à résidence à Vichy pendant la seconde guerre mondiale (80). Dans ce contexte, la phagothérapie a été abandonnée à cette période aux Etats-Unis ou en Europe de l'Ouest. Cependant, l'utilisations de bactériophages en médecine humaine a été poursuivie en Europe de l'Est et est toujours aujourd'hui une option thérapeutique majeure dans ces pays. L'institut Eliava à Tbilisi en Géorgie, fondé en 1923 par Félix d'Herelle et George Eliava, assure depuis sa création la production des cocktails de bactériophages (83). Ils étaient administrés dans ces pays dans de nombreuses indications à visée thérapeutique (dont les IOA) mais également préventive (7).

c) Emergence des résistances bactériennes au niveau mondial et regain d'intérêt pour la phagothérapie

L'émergence des résistances bactériennes aux antibiotiques liée à leur utilisation massive depuis plusieurs décennies est une source d'inquiétude majeure en santé publique. L'Organisation Mondiale de la Santé a souligné dans son premier rapport sur la résistance aux antibiotiques en 2015 la menace d'une « ère post-antibiotique » où les infections courantes redeviendraient mortelles (84). L'impossibilité de traiter certaines infections causées par des bactéries multi-résistantes serait actuellement responsable de 30 000 décès par an dans l'Union Européenne et 700 000 au niveau mondial, chiffre qui pourrait augmenter jusqu'à 10 millions en 2050 entraînant un coût de 100 billions de dollars (85,86). Le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques constitue donc une priorité pour la communauté médicale et scientifique internationale, qui s'intéresse au développement de la phagothérapie depuis le début des années 2000 mondialement. De nombreuses études, dont les résultats actuels sont synthétisés dans cette thèse, ont été conduites ou sont en cours dans le but d'isoler de nouveaux bactériophages et de décrire leur efficacité dans des modèles d'infections bactériennes ou dans le cadre d'essais cliniques. On assiste également à la création de centres spécialisés dans la production et/ou l'administration de bactériophages dans les pays occidentaux comme le centre de l'Université de Californie à San Diego aux Etats-Unis (Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics (IPATH)) ou l'hôpital militaire Reine Astrid en Belgique (87).

4) Mécanisme d'action des bactériophages

a) Cycle de réplication

Comme les autres virus, les bactériophages ne peuvent pas se multiplier par eux-mêmes. Ils ont besoin d'infecter une cellule hôte, la bactérie, dans le but de détourner la machinerie cellulaire à leur profit afin de produire de nouveaux virions. La première étape de ce cycle de réplication illustré sur la Figure 4 consiste en l'adsorption des bactériophages sur la bactérie. Cette étape nécessite un contact par collision aléatoire et repose sur une reconnaissance spécifique de récepteurs bactériens (lipopolysaccharide, peptidoglycane, acides teichoïques) par des protéines se situant à l'extrémité de la queue du phage. Le génome du bactériophage est alors injecté dans la bactérie et son devenir permet de séparer les phages en deux principaux groupes : les phages dits « virulents » ou « lytiques » et ceux dits « tempérés » ou « lysogéniques » (69).

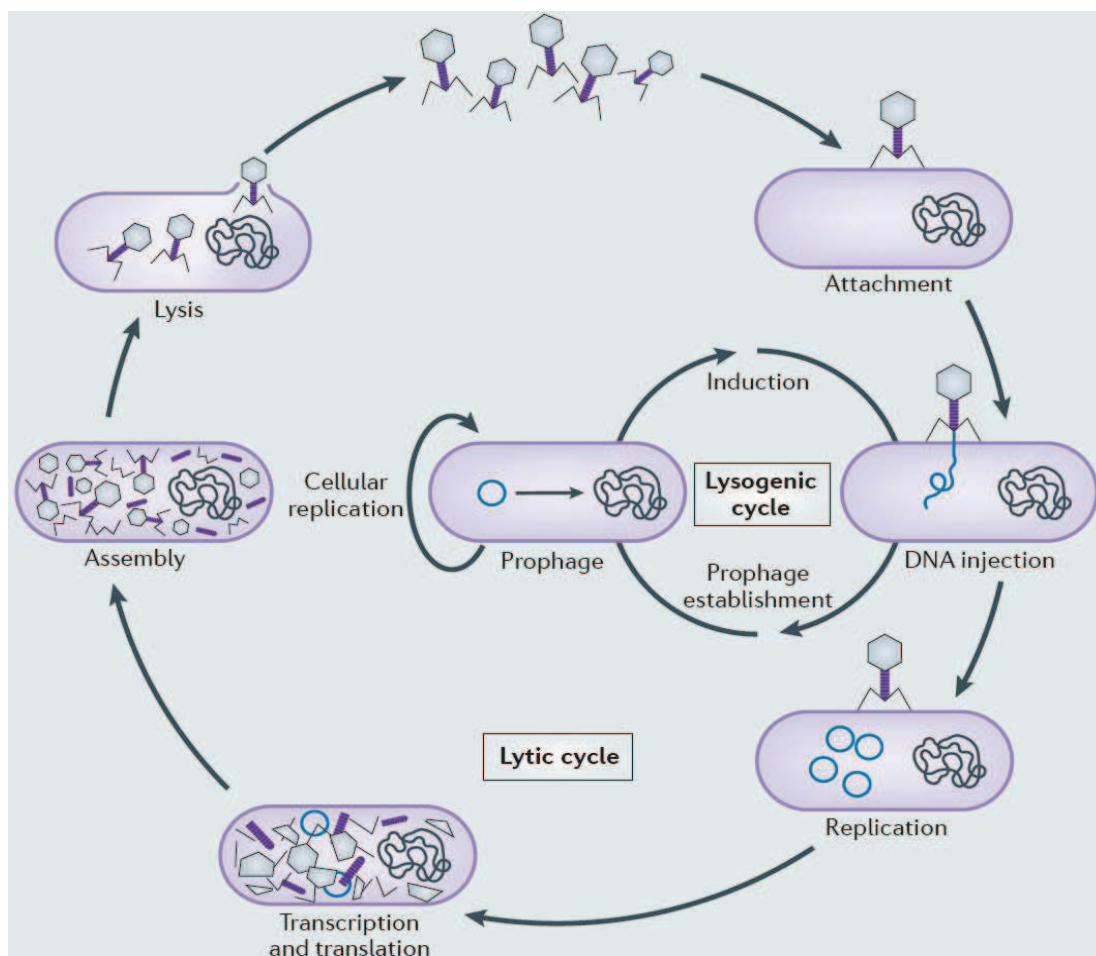


Figure 4 : Cycle de réplication des bactériophages (d'après Salmond *et al.* (69))

i. Cas des bactériophages lytiques

Les bactériophages virulents vont utiliser la machinerie cellulaire de la bactérie pour se répliquer en rentrant dans un cycle lytique qui va aboutir à la destruction de la bactérie et conférant donc aux bactériophages une activité bactéricide. L'expression des gènes précoces du bactériophage permet tout d'abord de rediriger le métabolisme bactérien vers la production d'acides nucléiques et protéines viraux. Après assemblage des nouveaux virions au sein de la bactérie, ils sont libérés lors de la lyse de la bactérie grâce à l'action d'enzymes (holines et lysines), dont le mécanisme d'action est décrit ci-après, et pourront infecter d'autres bactéries. Après une période de latence, correspondant à l'intervalle de temps entre l'adsorption des bactériophages et la lyse bactérienne nécessaire à l'infection et la réplication des premiers bactériophages, la production de nouveaux virions sera exponentielle jusqu'à atteindre un plateau, du fait de l'absence de bactéries encore vivantes pour assurer leur amplification. Le nombre moyen de particules virales actives libérées après chaque lyse bactérienne est appelé « *burst size* ».

ii. Cas des bactériophages tempérés

Dans le cas des bactériophages tempérés, après pénétration de l'acide nucléique dans la bactérie, le génome viral va s'intégrer dans le chromosome bactérien sous forme de prophage. Il est ensuite répliqué au sein du génome au cours d'une ou plusieurs générations. Les gènes viraux délétères pour la bactérie ne sont alors pas exprimés. Les prophages peuvent favoriser la survie bactérienne grâce à différents mécanismes : protection de l'infection par un phage lytique, gain de fonctions lié aux gènes viraux favorisant la multiplication bactérienne, augmentant la virulence ou la résistance aux antibiotiques. Sous l'action d'un stress, le matériel génétique du prophage peut être excisé du génome bactérien et entrer dans un cycle lytique, qui conduira à une destruction de la bactérie qui l'abrite selon le même processus que les bactériophages strictement lytiques. Dans le cas de la phagothérapie, les bactériophages lysogéniques ne sont pas utilisés afin d'éviter le risque de transfert de gènes codant pour des facteurs de virulence ou de résistance entre bactéries.

b) Production d'enzymes lytiques par les bactériophages

L'action lytique de la majorité des phages est liée à la présence d'une cassette génétique permettant la synthèse d'un couple de protéines synergiques, le système holine-endolysine.

i. Les holines (88)

Les holines sont responsables de la formation de pores (1 à 3 par bactérie, diamètre moyen de plus de 340 nm) dans la membrane cytoplasmique bactérienne. Elles permettent de contrôler la durée du cycle infectieux du phage avant lyse bactérienne. En effet, leur action intervient en synchronisation avec les phases de réplication tardive du bactériophage pour optimiser le moment de lyse qui ne doit pas être trop précoce afin qu'un maximum de néovirions soient assemblés, ni trop tardive afin de ne pas réduire les opportunités d'infection d'autres bactéries. Pour cela, elles s'accumulent au niveau de la membrane cytoplasmique sans dommage pendant les phases de réplication et d'assemblage des nouvelles particules virales. Une fois en concentration suffisante, les holines entraînent la perforation de la membrane cytoplasmique subitement, permettant ainsi l'accès des endolysines au peptidoglycane constituant la paroi bactérienne.

ii. Les endolysines (89–91)

Les endolysines (aussi connues sous le nom de lysines, enzymes mura/muréolytiques) sont un ensemble d'enzymes qui s'accumulent dans le cytoplasme bactérien pendant la réplication des bactériophages car elles ne peuvent être transloquées à travers la membrane cytoplasmique avant formation de pores par les holines et qui agissent donc à la fin du cycle viral.

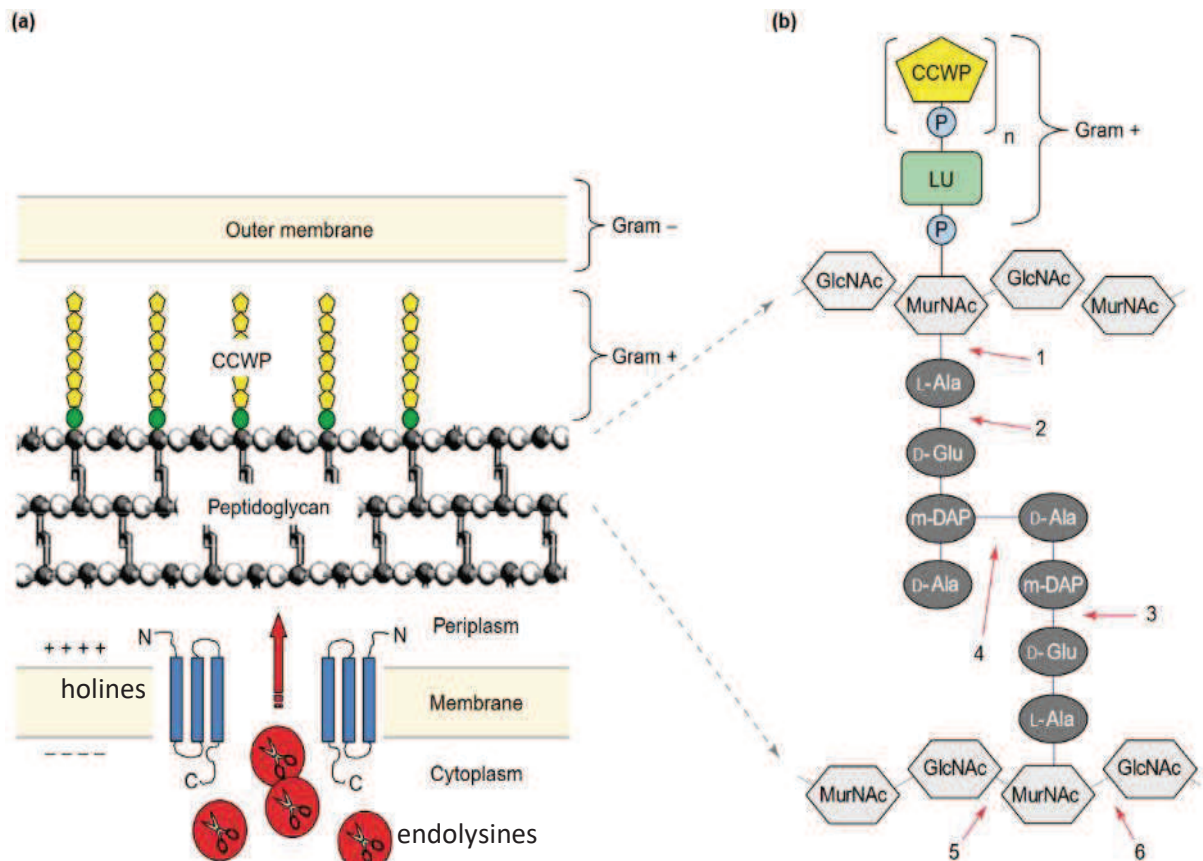


Figure 5 : Structure de la paroi bactérienne et cibles des endolysines (d’après Loessner *et al.* (91))

(a) Structure des bactéries à Gram positif et négatif. Après formation de pores dans la membrane bactérienne par les holines, les endolysines peuvent dégrader le peptidoglycane.

(b) Structure moléculaire du peptidoglycane de type A1 γ. Il est composé de deux peptides (gris foncé) reliés par un pont et de sucres (gris clair).

Les liaisons pouvant être dégradées par les endolysines sont désignées par les flèches rouges grâce aux activités enzymatiques suivantes : N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (1), L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase (2), D-glutamyl-m-DAP endopeptidase (3), endopeptidase agissant sur le pont interpeptide (4), β-N-acetylglucosaminidase (5), N-acetylmuramidase (ou muramoylhydrolase ou lysozyme) (6)

Abréviations : CCWP : carbohydrate cell wall polymer, GlcNAc : N-acetyl glucosamine, LU : linkage unit, m-DAP : meso diaminopimelic acid, MurNAc : N acetyl muramic acid, P : groupement phosphate.

Les endolysines permettent alors la dégradation de la paroi bactérienne en hydrolysant les liaisons du peptidoglycane grâce à différentes activités enzymatiques (Figure 5) : amidase, endopeptidase et dégradation des liaisons du groupement carbohydrate. La forte pression intracellulaire entraîne alors une fuite du cytoplasme bactérien vers l’extérieur et une lyse osmotique de la bactérie puis la libération de nouveaux virions.

Les endolysines ont une structure différente selon le type de bactéries cibles, en lien avec les différences de composition et de structure de leurs parois. Les endolysines actives sur les bactéries à Gram positif sont composées de deux domaines. Le domaine N-terminal porte l'activité enzymatique. Le domaine C-terminal est responsable de la spécificité d'action et de la haute affinité de l'endolysine envers son substrat en permettant l'attachement à la paroi bactérienne. Il agit également comme un domaine régulateur en bloquant l'activité enzymatique du domaine N-terminal tant qu'il n'a pas reconnu son ligand. Les endolysines agissant sur les bactéries à Gram négatif sont, quant à elles, de petites protéines globulaires composées d'un seul domaine enzymatique.

Ces enzymes peuvent également agir par voie exogène lorsque le peptidoglycane est accessible (bactéries à Gram positif), sans que la bactérie soit infectée par le bactériophage. Au contraire, la membrane externe des bactéries à Gram négatif les protège théoriquement contre leur action. Cette propriété, même si pour l'instant principalement limitée aux bactéries à Gram positif, permet d'envisager l'utilisation de ces lysines en thérapeutique (« enzybiotiques ») en alternative à la phagothérapie. Par exemple, la lysine CF-301 active contre les staphylocoques, est actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2 pour traiter des patients atteints de bactériémie ou d'endocardite à SARM (92).

II. Intérêt et utilisation des bactériophages en thérapeutique humaine

1) Antibiotiques et bactériophages

a) Avantages des bactériophages par rapport aux antibiotiques

Les bactériophages sont une alternative thérapeutique intéressante par rapport à l'antibiothérapie grâce à plusieurs avantages. Tout d'abord, les bactériophages sont les seuls agents antibactériens dont la concentration augmente au niveau du foyer infectieux avec le temps grâce à leur capacité à se multiplier rapidement en présence de bactéries (93,94). Cette propagation virale permet théoriquement d'obtenir un « traitement autoentretenu » jusqu'à ce que les bactéries soient éliminées alors que les antibiotiques sont, eux, éliminés et/ou dégradés rapidement et doivent faire l'objet d'administrations répétées parfois plusieurs fois par jour ou en continu. Contrairement aux antibiotiques qui sont responsables d'effets indésirables importants (atteinte rénale, hépatique ou auditive, allergie etc.), les études décrivant l'utilisation de bactériophages chez l'homme (détaillées plus loin dans cette thèse) ne rapportent pas ou peu d'effets iatrogènes pouvant leur être attribués si la suspension de bactériophages est bien purifiée (élimination des toxines bactériennes). Par ailleurs, les bactériophages ont un faible impact sur le microbiote intestinal grâce à leur spécificité d'hôte (95,96). Ceci est un avantage majeur par rapport aux antibiotiques qui peuvent être responsables de la destruction d'une partie de la flore digestive normale et de l'apparition d'une dysbiose à l'origine i) d'effets indésirables parfois importants (troubles digestifs, infections opportunistes secondaires comme les mycoses ou les diarrhées à *Clostridium difficile*) et ii) l'émergence d'espèces bactériennes résistantes à ces antibiotiques. Enfin, les bactériophages restent actifs sur les bactéries présentant des résistances aux antibiotiques puisque leurs mécanismes d'action sont complètement différents (97).

En revanche, le principal inconvénient de l'utilisation des bactériophages est leur spectre d'action étroit (restreint à une espèce bactérienne) qui limite leur utilisation en traitement probabiliste, contrairement aux antibiotiques à spectre large. La mise en place du traitement nécessite au préalable l'isolement de la souche bactérienne pour caractériser sa sensibilité aux différents bactériophages grâce à la réalisation du « phagogramme » (voir paragraphe II.2.) afin de sélectionner les plus actifs.

b) Association synergique des bactériophages avec les antibiotiques

L'effet synergique de l'association entre bactériophages et antibiotiques (effet de l'association supérieur à la somme des effets des deux agents utilisés séparément) a été démontré dans de nombreuses études *in vitro* pour différentes classes d'antibiotiques (β -lactamines, fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines) et est couramment nommé effet « PAS » dans la littérature (*Phage-Antibiotic Synergy*) (98). Cette synergie est expliquée par le fait que des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques peuvent stimuler la production de bactériophages par la bactérie infectée, probablement en favorisant l'apparition de phénotypes de type filamentation ou aggrégation des bactéries suite à l'activation du système SOS de réponse au stress (99–103). Kim *et al.* ont montré qu'un retard de la lyse des bactéries infectées par des bactériophages était observé en cas d'utilisation concomitante d'antibiotiques, permettant un allongement du temps pendant lequel de nouveaux virions pouvaient être assemblés au sein de la bactérie (103). Ce retard était expliqué dans cette étude par le fait que l'augmentation de la production d'holines en présence d'antibiotiques était insuffisante par rapport à l'augmentation de la taille de la bactérie pour entraîner la formation de pores dans la membrane aussi rapidement qu'en l'absence d'antibiotiques. L'effet PAS pourrait être observé même en cas de résistance aux antibiotiques et a été décrit aussi bien pour des bactéries en phase planctonique ou dans des biofilms (101,104).

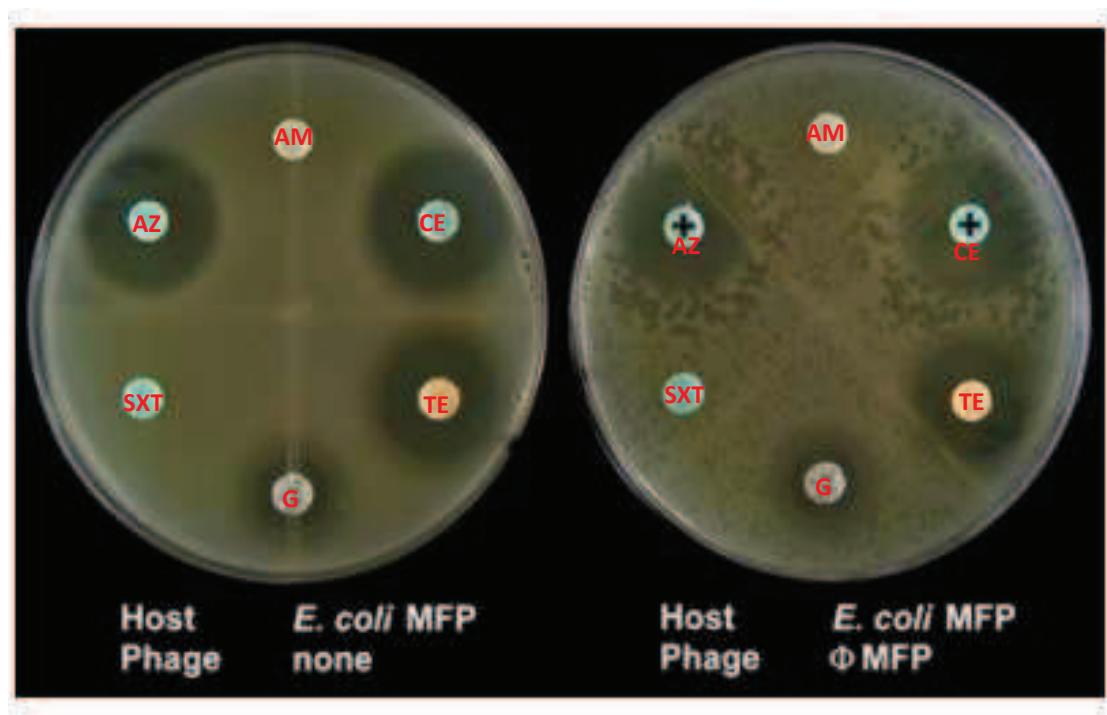


Figure 6 : Illustration de l'effet synergique observé par Comeau *et al.* entre antibiotiques et bactériophages (99).

A gauche : diamètres d'inhibition de croissance d'*E. coli* formés en présence de disques imprégnés d'antibiotiques (en l'absence de bactériophages)

A droite : visualisation de plages de lyse bactérienne par les bactériophages de taille augmentée en cas de synergie entre le bacteriophage Φ MFP et certains antibiotiques (disques contenant de l'aztréonam (AZ) ou de la céfixime (CE) marqués d'un +) ou de taille normale en présence des autres antibiotiques (gentamicine (G), cotrimoxazole (SXT), tétracycline (TE) ou amoxicilline (AM))

La Figure 6 illustre l'effet PAS observé dans l'étude de Comeau *et al* (99). Des disques d'antibiotiques sont déposés sur une gélose contenant des bactériophages en présence d'un tapis bactérien (*E. coli*). Dans cet exemple, la taille des plages de lyse bactérienne entraînées par la multiplication des bactériophages augmente (plus de bactériophages produits) en présence de β -lactamines comme l'aztréonam ou la céfixime alors qu'elle n'est pas modifiée en présence de gentamicine, cotrimoxazole, tétracycline ou amoxicilline.

L'intérêt de l'association bactériophages-antibiotiques a aussi été démontré dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* d'infections détaillés dans le paragraphe II.3.

2) Caractérisation de l'activité antibactérienne des bactériophages sur les bactéries planctoniques : réalisation du « phagogramme »

Avant l'utilisation de bactériophages dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* d'infections humaines, puis chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques ou de traitements compassionnels, leur activité doit dans un premier temps être caractérisée sur les bactéries dans leur forme planctonique. La détermination de la sensibilité d'une souche bactérienne aux bactériophages correspond à l'étude de la capacité de ces derniers à infecter les bactéries, se multiplier et entraîner leur lyse. L'association de deux techniques complémentaires est généralement utilisée pour la réalisation du « phagogramme ».

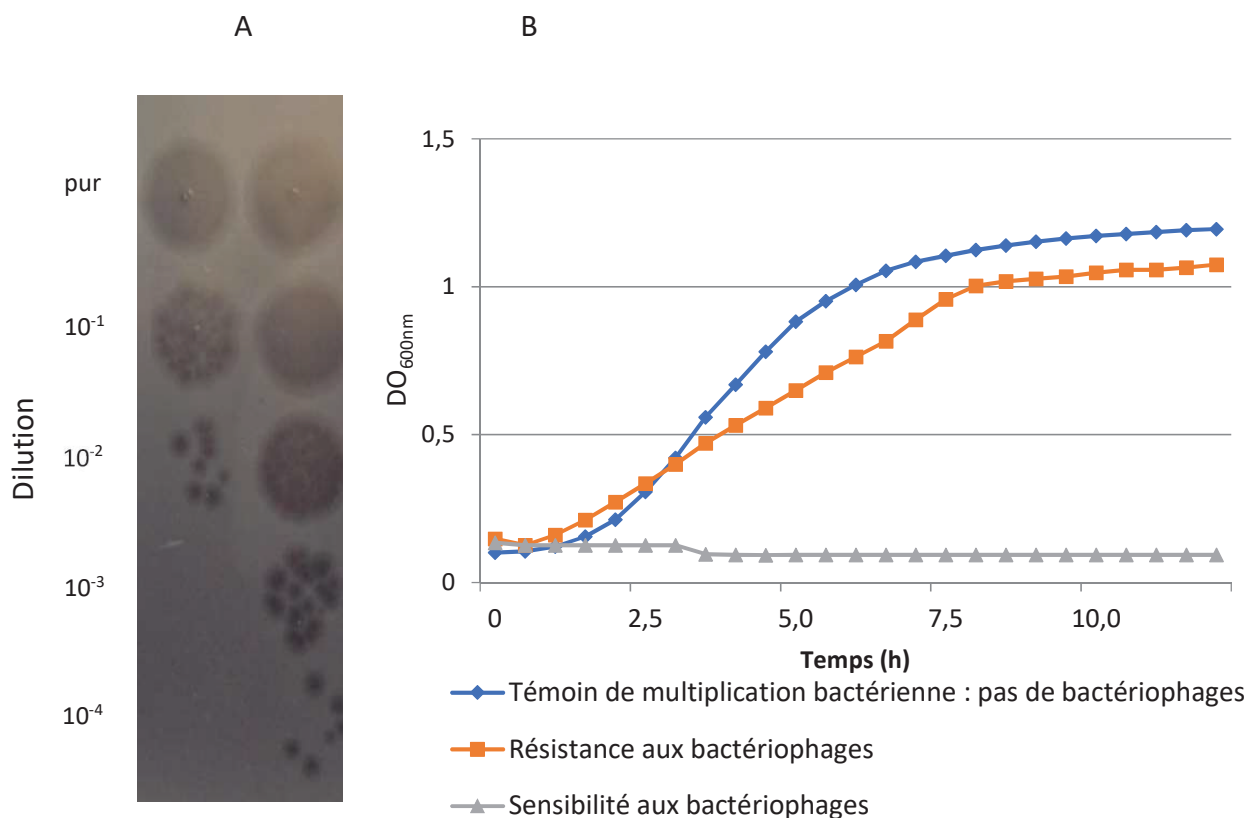


Figure 7 : Illustration des techniques utilisées pour la réalisation du « phagogramme »

A : Visualisation des PFU obtenus avec la technique *spot test*. Pour les dilutions de la suspension de phages les plus faibles (pur à 10^{-1} à gauche ou 10^{-3} à droite), les PFU sont confluent et non dénombrables. On dénombre respectivement 8 et 6 PFU aux dilutions 10^{-2} et 10^{-4} à gauche et à droite.

B : Evolution de la DO_{600nm} au cours du temps permettant de suivre la multiplication bactérienne en l'absence ou en présence de bactériophages

a) Technique spot test et calcul du score EOP (Efficiency of plating)

La réalisation du *spot test* repose sur la visualisation de plages de lyse bactérienne appelées « PFU » (*Plaque forming units*) grâce à la culture de la souche bactérienne en milieu solide en présence de différentes dilutions d'une suspension de bactériophages (habituellement dilutions successives au $1/10^{\text{ème}}$). Si le bactériophage est actif sur la bactérie, après une nuit d'incubation, on observe la formation des PFU correspondant à une zone d'inhibition de la croissance bactérienne par les bactériophages. Lorsque les bactériophages sont concentrés, les PFU sont confluentes et indénombrables à des dilutions faibles mais deviennent dénombrables pour les dilutions les plus importantes (Figure 7A). Le calcul du score EOP permet de normaliser le titre phagique obtenu en rapportant le nombre de PFU obtenu pour la souche d'intérêt à celui obtenu pour une souche de référence fortement sensible à ce bactériophage. Plus ce score est proche de 1, plus la souche test est sensible au bactériophage testé (nombre de phages nécessaires à la production d'une PFU lors de l'infection de la souche test comparable à celui obtenu avec la souche de référence) et plus le bactériophage est efficace sur cette souche. Au contraire, plus il est proche de 0, moins le bactériophage est actif (105). Cependant, la formation et la visibilité des PFU peuvent être influencées par la période de latence du phage, le nombre de phages libérés après la lyse de la bactérie infectées et la diffusion des bactériophages dans la gélose.

b) Etude de la sensibilité aux bactériophages en milieu liquide (Killing assay)

Pour cette technique, les bactéries sont incubées en présence de bactériophages en milieu liquide à différentes concentrations ou MOI (*Multiplicity of Infection*, correspondant au nombre de phages par bactérie) ou en l'absence de phages. L'interprétation de la courbe de croissance bactérienne obtenue par suivi de la mesure de la déviation optique à 600 nm ($DO_{600\text{nm}}$) au cours du temps, permet alors de caractériser la sensibilité des bactéries aux bactériophages. En cas de sensibilité aux bactériophages, les bactéries ne se multiplient pas et la $DO_{600\text{nm}}$ reste proche de sa valeur initiale (Figure 7B). Au contraire en cas de résistance bactérienne aux bactériophages, les bactéries parviennent à se multiplier et la $DO_{600\text{nm}}$ augmente. Henry *et al.* ont également proposé l'utilisation du système OmniLog™ (suivi de la réduction du sel de tetrazolium entraînant un changement de couleur du milieu lors de la respiration bactérienne) pour caractériser l'activité des bactériophages en milieu liquide (106). Ces méthodes ont l'avantage de pouvoir être partiellement automatisées (suivi par un

automate de la DO) et de limiter les erreurs liées à la variabilité humaine dans la lecture manuelle des PFU dans le cas du *spot test* (106,107).

c) Corrélation entre sensibilité in vitro et efficacité in vivo

Il n'existe pas de protocoles standardisés pour ces deux types de techniques et les résultats peuvent être parfois difficiles à interpréter. Nous manquons également de données pour savoir si l'étude de la sensibilité d'une bactérie aux bactériophages *in vitro* est corrélée au succès thérapeutique *in vivo*. En effet, l'environnement complexe du corps humain (production d'anticorps, d'enzymes etc.) peut théoriquement limiter l'activité des bactériophages entraînant une surestimation de l'activité des bactériophages par les tests *in vitro*. Une étude de Henry *et al.* s'est intéressée à la corrélation entre les tests de sensibilité *in vitro* d'une souche de *P. aeruginosa* à 9 bactériophages et les taux de survie de souris présentant une pneumonie et traitées par chacun de ces bactériophages (108). Les bactériophages les plus actifs *in vivo* présentaient un score EOP élevé et une bonne activité en milieu liquide. Néanmoins, alors que deux des bactériophages avaient des scores EOP élevés et une activité en milieu liquide similaire, ils étaient associés à des taux de mortalité très différents (15% vs. 50%). L'activité *in vitro* n'est donc pas forcément synonyme d'une activité *in vivo*. Ces données constituent un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation en thérapeutique non pas d'un seul bactériophage mais d'un assemblage de plusieurs bactériophages.

3) Evaluation de l'efficacité thérapeutique des bactériophages

a) Modèles in vitro : activité sur les bactéries sanctuarisées

i. Evaluation de l'activité des bactériophages sur le biofilm

L'utilisation de bactériophages pour leur activité sur le biofilm est intéressante par plusieurs aspects. Tout d'abord, la forte densité bactérienne au sein du biofilm permet une multiplication importante des bactériophages. De plus, malgré le ralentissement du métabolisme bactérien au sein du biofilm, qui peut entraîner une diminution du nombre de nouveaux virions produits, leur capacité à infecter ces bactéries n'est pas réduite (109,110). Pearl *et al.* ont montré que les bactériophages pouvaient infecter des bactéries en dormance ou « persisters », puis se multiplier et entraîner la lyse bactérienne une fois que ces bactéries redeviennent métaboliquement actives (111). La production d'endolysines et la présence d'exo-polysaccharides dépolymérase (endorhamnosidase et dégradation du

lipopolysaccharide, alginate lyase, endosialidase, hyaluronidase) au niveau de la queue du bactériophage permettent également de dégrader la matrice du biofilm (112,113). Enfin, les bactériophages peuvent également induire la production d'enzymes dépolymérase par la bactérie elle-même (114). Ces différentes propriétés permettent d'augmenter la pénétration des bactériophages ou des antibiotiques dans le biofilm mature ainsi que d'augmenter la sensibilité des bactéries à l'action des antibiotiques en cas de traitement combiné (exposition des bactéries aux nutriments après destruction de la matrice et reprise de leur multiplication) (112).

De nombreuses études ont ainsi décrit l'effet de bactériophages contre des biofilms formés par des bactéries à Gram positif et négatif dans différents modèles *in vitro*. Le Tableau 1 détaille les études ayant comparé l'action de bactériophages à celles d'antibiotiques et démontré l'intérêt de les associer pour obtenir un effet synergique pour éradiquer le biofilm formé par différentes espèces bactériennes (entérobactéries, *P. aeruginosa*, *S. aureus*).

Tableau 1 : Etudes rapportant l'efficacité de bactériophages en comparaison ou association à des antibiotiques pour le traitement de biofilms dans des modèles in vitro

Référence	Bactérie	Phage(s)	Antibiotique	Modèle de biofilm	Principales observations
Tkhilaishvili 2018 (115)	<i>S. aureus</i> (SARM)	Sb-1	F, RIF, GP, D, Q	Billes de verre	- Activité dose dépendante des bactériophages sur la matrice du biofilm - Intérêt de l'administration des bactériophages avant les antibiotiques vs traitement simultané
Yazdi 2018 (116)	<i>P. mirabilis</i>	vB_PmiS-TH	BL	Plaque 96 puits	- Synergie ampicilline/phage
Kumaran 2018 (117)	<i>S. aureus</i>	SATA-8505	BL, GP, TC, LZ	Plaque 48 puits	- Effets faibles de la monothérapie par bactériophages ou antibiotiques - Synergie si application des bactériophages avant les antibiotiques (vancomycine, cefazoline aux faibles concentrations)
Chaudhry 2017 (118)	<i>P. aeruginosa</i>	NP1, NP3 et cocktail	BL, Q, Col, AM	- Plaque 24 puits - Cellules épithéliales	- Effets modérés de la monothérapie phages ou antibiotiques - Synergie de certaines combinaisons phages – antibiotiques (ceftazidime, ciprofloxacine) - Intérêt de l'administration des bactériophages 24h avant les aminosides
Mapes 2016 (119)	<i>P. aeruginosa</i>	Cocktail 4 ϕ C ³⁰	Q	Plaque 96 puits	- Activité dose dépendante des bactériophages pour la prévention et traitement du biofilm - Activité comparable à la levofloxacine
Coulter 2014 (120)	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	T4, PB-1	AM	Disques silicone	- Phage T4 plus efficace que la tobramycine pour traiter les biofilms à <i>E. coli</i> et association tobramycine-T4 permet d'augmenter l'efficacité bactéricide et de réduire le nombre de bactéries résistantes à la tobramycine ou au phage dans le biofilm - Phage P-B1 moins efficace que la tobramycine pour traiter le biofilm à <i>P. aeruginosa</i> et association tobramycine-PB-1 permet la réduction du nombre de bactéries résistantes au phage ou à l'antibiotique dans le biofilm à <i>P. aeruginosa</i> sans effet bactéricide supérieur à l'antibiotique seul
Ryan 2012 (104)	<i>E. coli</i>	T4	BL	MBEC Calgary	- Faibles concentrations de cefotaxime entraînent une augmentation de production de phages T4 - Association synergique cefotaxime-T4 : réduction concentration minimale pour éradication du biofilm (MBEC) du cefotaxime
Rahman 2011 (121)	<i>S. aureus</i> (SARM)	SAP-26	RIF, M, GP	Plaque 96 puits	- Synergie phages/antibiotiques, maximale avec la rifampicine
Verma 2010 et 2009 (122,123)	<i>K. pneumoniae</i>	KPO1K2	Q	Plaque 96 puits	- Action antibiofilm des phages : dépolymérase dépendante (modification de la matrice, diminution taille des microcolonies) - Synergie phages/ciprofloxacine, association permet d'empêcher l'émergence de mutants résistants à la ciprofloxacine

Abréviations : BL : beta lactamines, Q : quinolones, Col : colistine, AM : aminosides, GP : glycopeptides, TC : tetracycline, LZ, linezolid RIF : rifampicine, M : macrolides, F : fosfomycine, D : daptomycine, SARM : *S. aureus* résistant à la méticilline

Trois études récentes ont notamment rapporté que l'effet de l'association de bactériophages anti-*P. aeruginosa* et anti-*S. aureus* et de certains antibiotiques (aminosides et vancomycine ou cefazoline respectivement) contre le biofilm était augmenté si les bactériophages étaient utilisés avant l'ajout des antibiotiques (115,117,118). D'autres travaux ont permis de montrer que la combinaison de bactériophages et d'antibiotiques permet également de diminuer la fréquence d'émergence de mutants résistants aux antibiotiques au sein du biofilm, phénomène fréquent en cas de monothérapie (120,122,124).

La formation de biofilm était bien documentée dans les IOA chroniques, l'utilisation de bactériophages paraît prometteuse dans cette indication.

ii. Evaluation de l'activité des bactériophages sur les bactéries intracellulaires

Il était traditionnellement admis qu'il n'y avait pas d'interactions entre les phages et les cellules eucaryotes. Cependant, plusieurs études ont remis en question cette hypothèse et suggèrent qu'ils seraient capables i) d'induire des signaux intracellulaires après interaction avec les mucines transmembranaires, ii) d'être internalisés dans les cellules eucaryotes par phagocytose, pinocytose, endocytose après reconnaissance de récepteurs membranaires (acide sialique, intégrines) ou en même temps que des bactéries qu'ils ont infectées (mécanisme de « cheval de Troie ») (67,125,126). Cependant, seulement deux études se sont intéressées à l'évaluation de leur capacité à éradiquer les bactéries internalisées dans des cellules phagocytaires (macrophages ou cellules phagocytaires non professionnelles). Zhang *et al.* ont montré que le phage B_SauM_JS25 pouvait pénétrer dans des cellules épithéliales bovines et permettait la diminution de la quantité de *S. aureus* intracellulaires par rapport aux cellules non traitées (127). Cependant, une seconde étude a montré que le traitement de macrophages infectés par *S. aureus* par des bactériophages seuls ne permettait pas d'augmenter l'activité bactéricide des macrophages. Dans cette même étude, l'adsorption préalable des bactériophages sur des bactéries avant application sur des cellules entraînait une diminution significative de la quantité de bactéries intracellulaires par rapport à des macrophages non traités (128).

b) Données précliniques : modèles animaux *in vivo*

L'efficacité des bactériophages a été rapportée dans de nombreuses études utilisant des modèles animaux de différents types d'infections : pneumopathies et infections respiratoires

dans le contexte de mucoviscidose (129–135), bactériémie (136–142), endocardite (143), méningite (144), infections de la peau et brûlures (145–147), IOA (148–150) et ulcérations du pied diabétique (148–151). Ces différents travaux ont permis l'évaluation i) de plusieurs voies d'administrations, ii) de l'intérêt de l'utilisation des bactériophages en comparaison ou en association à des antibiotiques et iii) de l'influence du délai avant instauration de la thérapeutique et de la quantité de phages administrée sur l'efficacité de la phagothérapie (141,144,149).

Trois études portant sur des modèles animaux d'IOA ont été réalisées à ce jour. Yilmaz *et al.* ont notamment comparé l'utilisation d'un bactériophage et d'un antibiotique en monothérapie et bithérapie dans un modèle d'ostéomyélite à SARM ou *P. aeruginosa* (148). Cette étude a mis en évidence une synergie entre les bactériophages et les antibiotiques (teicoplanine et imipénème respectivement) sur la réduction de l'inoculum bactérien au niveau du foyer infecté, alors que les phages utilisés seuls n'étaient pas aussi efficaces que les antibiotiques. L'association du bactériophage anti *S. aureus* et de la teicoplanine a permis dans ce modèle d'éradiquer le biofilm formé au niveau de l'implant. Dans un second modèle d'ostéomyélite à SARM, Kishor *et al.* ont montré que le traitement par un cocktail de 7 bactériophages permettait d'obtenir une éradication de l'infection, sans séquelles radiologiques (149). Enfin, Kaur *et al.* ont proposé l'utilisation préventive de bactériophages dans un modèle murin d'infection SARM sur prothèse (150). L'implant en acier était coaté par des bactériophages, du linézolide ou l'association de deux agents. L'efficacité prophylactique de cet implant était maximale en cas de combinaison des bactériophages et du linézolide.

c) *Evaluation de l'utilisation des bactériophages en thérapeutique humaine*

- i. De l'expérience de l'Europe de l'Est aux traitements compassionnels par bactériophages en Europe de l'Ouest

Les bactériophages sont utilisés couramment en thérapeutique humaine depuis plusieurs décennies, principalement dans l'ex-Union Soviétique (Géorgie, Russie) et en Pologne, grâce à leur production par l'Institut Eliava (Tbilisi, Géorgie), sous forme de solutions contenant un ou plusieurs bactériophages (sous forme de cocktails nommés « pyophage », « intestiphage » etc., encore aujourd'hui commercialisés) dirigés contre différentes espèces bactériennes (*S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*) (Figure 8). Ils sont administrés par voie orale (sous forme liquide ou de comprimés), locale (compresses imprégnées, crèmes), rectale, intraveineuse ou sous forme d'aérosols dans différents domaines (chirurgie, dermatologie, pneumologie, gynécologie, urologie, ophtalmologie etc.) à la fois à visée curative ou préventive (152).



Figure 8 : Préparations de bactériophages produits par l'institut Eliava pour le traitement et la prophylaxie d'infections bactériennes (d'après Kutateladze *et al.* (152))

(A) Bactériophage anti-staphylocoque. (B) Pyo-Phage (bactériophages anti *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*)

Les résultats de l'expérience de la phagothérapie de ces pays ont malheureusement été peu publiés ou sous forme d'articles peu accessibles pour la communauté scientifique internationale car rédigés généralement en russe. Ils sont brièvement synthétisés dans quelques articles en anglais regroupant des milliers de cas dans lesquels le taux de guérison

global annoncé est de plus de 90% (7,152,153). Cependant, il est très difficile d'analyser ces résultats qui présentent un faible niveau de preuve scientifique à cause de l'hétérogénéité des infections qui sont peu détaillées (site, bactérie, caractère aigu ou chronique, mono ou polymicrobien), de l'absence de groupe contrôle et de description des critères utilisés pour définir le succès thérapeutique, de la nature subjective de l'analyse, de l'absence de données sur les antibiotiques utilisés en comparaison ou en association aux bactériophages et du manque d'analyse statistique des résultats.

Face à l'émergence de pathogènes multi-résistants, plusieurs équipes médicales de pays occidentaux (principalement Etats Unis, France et Belgique) ont eu recours à la phagothérapie ces dernières années pour le traitement compassionnel de "sauvetage" de patients pour lesquels aucune alternative thérapeutique n'était disponible, pour la plupart avec l'accord des agences nationales du médicament (Agence nationale pour la sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM) en France, *Food and Drug Administration* (FDA) aux Etats-Unis). Six patients ont notamment été traités à ce jour aux Hospices Civils de Lyon en collaboration avec la société française Pherecydes (5 cas d'IOA complexes et un cas d'endocardite infectieuse) dont deux cas ont été récemment publiés (9,10). Le Tableau 2 synthétise les articles rapportant l'utilisation de bactériophages produits par des pays occidentaux.

Tableau 2 : Synthèse des articles rapportant l'utilisation de bactériophages produits dans des pays occidentaux pour des traitements « compassionnels »

Référence	Infection	Bactérie	Phages (Origine)/Contrôle taux d'endotoxines/Accord agence nationale de santé/modalités d'administration	Antibiotiques associés	Evolution clinique
Aslam 2019 (USA) (154)	H, 65 ans Infection de matériel cardiaque	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline	Cocktail de 3 phages AB-SA01 (AmpliPhi Biosciences) Accord FDA IV 3.10 ⁹ PFU toutes les 12h pendant 28 jours	Céfazoline, minocycline	Amélioration clinique et biologique (hémoglobine) dès la première semaine Cultures préopératoires négatives pour semaines 1, 2, 4 et positives à la semaine 3 Culture peropératoires négatives sauf celles des prélèvements du matériel Bonne évolution post opératoire
Lavergne 2018 (USA) (155)	F, 65 ans Infection cérébrale post opératoire	<i>Acinetobacter baumannii</i> multi résistant (sensible uniquement à la colistine)	Sélection de 5 phages actifs (librairie NMRC) Purification (gradient cesium, dialyse), dilution afin d'avoir taux endotoxine < 5 EU/kg Accord FDA IV 2.10 ⁷ PFU/mL toutes les 2h pendant 8 jours	Colistine	Persistance hyperleucocytose et fièvre Décès après arrêt des bactériophages <u>Résultats complémentaires</u> : Titrations phages sang : 110 PFU/mL 5 min après le bolus puis indétectable
Ferry 2018 (France) (9)	H, 60 ans IOA post radiothérapie et cimentoplastie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi résistant (sensible uniquement à la colistine et ceftolozane-tazobactam)	Sélection de 4 phages actifs (Pherecydes Pharma) Taux endotoxine < 1–5 EU/mL pour 10 ¹⁰ PFU/mL Accord ANSM Administration locale (30mL à 1.2–9.7.10 ⁸ PFU/mL ; contact pendant 4h), 4 administrations espacées de 3 jours	Colistine (application locale), ceftolozane tazobactam	Reconstruction locale rapide et favorable, cultures bactériennes stériles Décès suite à l'évolution métastatique du cancer pulmonaire
Ferry 2018 (France) (10)	F, 80 ans IOA récidivante prothèse de hanche sans nouvelle chirurgie adaptée possible	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi résistant ; <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Staphylococcus lugdunensis</i> sensibles à la méticilline ; <i>Enterococcus faecalis</i>	Sélection de 3 phages actifs sur <i>P. aeruginosa</i> et 3 phages théoriquement actifs sur <i>S. aureus</i> car pas d'étude de la sensibilité possible (Pherecydes Pharma) Accord ANSM Injection unique intraarticulaire pendant la chirurgie arthrotomie/lavage, 10 ¹⁰ PFU	Daptomycine 3 mois puis amoxicilline + clindamycine jusqu'à 6 mois puis amoxicilline seule en suppressif	Traitement médicochirurgical d'une surinfection à <i>Citrobacter koseri</i> 8 mois après l'arrêt des bactériophages Evolution favorable 18 mois après l'arrêt des bactériophages
Aslam 2018 (USA) (94)	H, 67 ans Pneumopathie récurrente chez un greffé pulmonaire	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi résistant	Sélection de bactériophages actifs et utilisation de plusieurs cocktails car développement de résistances au cours du traitement (librairie NMRC et AmpliPhi Biosciences) Accord FDA Administration IV et voie inhalée	Antibiotique administré sans précisions	Evolution favorable <u>Résultats complémentaires</u> : Titration phages : concentrations équivalentes dans le poumon si administration IV ou non + multiplication au niveau pulmonaire

Tableau 2 (suite)

Référence	Infection	Bactérie	Phages (Origine)/Contrôle taux d'endotoxines/Accord agence nationale de santé/modalités d'administration	Antibiotiques associés	Evolution clinique
Chan 2018 (USA) (156)	H, 76 ans Infection récurrente médiastinale et d'endoprothèse aortique sans chirurgie possible	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (restant sensible malgré de multiples traitements par ceftazidime)	Phage OMK01 Purification (colonne, dialyse), dilution afin d'avoir taux endotoxine < 12.5 EU/mL Accord FDA Injection unique dans l'abcès, 10 ⁸ PFU	Ceftazidime (local et IV)	Après 4 semaines : perforation aortique infectée par <i>C. albicans</i> Pas de nouvelle infection à 18 mois après arrêt des antibiotiques
Jennes 2017 (Belgique) (157)	H, 61 ans Bactériémie (arrêt antibiothérapie nécessaire devant apparition d'une insuffisance rénale)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistant (sensible uniquement à la colistine)	Cocktail BFC1 (2 phages) de l'hôpital militaire Queen Astrid actif <i>in vitro</i> IV (perfusion 6h) + irrigation escarres 10 jours	Pas d'antibiotiques	Négativation immédiate des hémocultures, diminution fièvre et CRP, amélioration fonction rénale Pas de cicatrisation des escarres, décès à 4 mois après une septicémie à <i>K. pneumoniae</i>
Schooley 2017 (USA) (158)	H, 68 ans Pancréatite infectée	<i>Acinetobacter baumannii</i> multirésistant	Sélection de 3 cocktails : IV (4 phages), PC (4 phages) et IVB (2 phages dont 1 du cocktail IV) utilisés séquentiellement car apparition de résistances sous traitement (librairie NMRC et CPT) Purification (gradient césium, dialyse), dilution afin d'avoir taux endotoxine < 5 EU/kg ; Accord FDA Administration IV (5.10 ⁹ PFU) et intrapéritonéale (drainage) pluriquotidiennes pendant 20 semaines au total	Méropénème Minocycline	Peu d'évolution après premières administrations intrapéritonéales Réveil du coma après injection IV (concomitamment à l'instauration de la minocycline) Evolution favorable <u>Résultats complémentaires</u> : Titration phages sang : 18 000 PFU/mL 5 min après bolus IV, diminution d'environ 1 log toutes les 30 min, plus détectable après 3h

Abréviations :

FDA : Food and Drug Administration, ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du médicament et des produits de santé, IV : administration intraveineuse
BPF : Bonnes pratiques de production pharmaceutiques ; lieux de production : NMRC : Naval Medical Research Center (USA), Pherecydes Pharma (France), Ampliphi (USA), CPT : Center for Phage Technology (USA)

Les indications de la phagothérapie correspondaient à des infections très sévères et difficiles à traiter car causées par des bactéries multi-résistantes et/ou multi-récidivantes. Il s'agissait de traitement de dernier recours. Les auteurs mettent pour la plupart en avant la sélection personnalisée des bactériophages les plus actifs (parfois après un screening de centaines de bactériophages) sur les souches isolées chez les patients alors que les travaux d'Europe de l'Est rapportent plutôt l'utilisation de « cocktails commerciaux préformés » dont l'activité n'était en général pas vérifiée avant administration.

Les voies d'administration (application locale, intraveineuse, intra-articulaire ou intra-tissulaire, pulmonaire) et les schémas posologiques (durées, fréquences de répétition des administrations, quantités de bactériophages) présentés dans ces articles sont très variés, en lien avec la grande diversité des infections mais aussi avec l'absence de données sur l'optimisation de ces traitements. Même si l'administration concomitante de bactériophages et d'antibiotiques dans la plupart des cas ne permet pas de conclure sur la réelle efficacité des bactériophages, 7 articles sur 8 décrivent une évolution favorable de l'infection. Deux décès sont survenus sans lien avec l'infection initiale (9,157). Par ailleurs, le patient décrit par Jennes *et al.* n'a pas reçu d'antibiotiques en même temps que les bactériophages et celui décrit par Chan *et al.* a été traité par ceftazidime, antibiotique précédemment administré dans des épisodes de bactériémies similaires sans efficacité à long terme suggérant que les bactériophages auraient permis l'éradication de l'infection (156,157). Enfin, il est à noter qu'aucun effet indésirable n'a été déploré dans ces rapports d'expérience, notamment après l'administration intraveineuse. Ces différents articles soulignent l'importance de la purification des préparations de bactériophages pour éliminer les endotoxines bactériennes.

ii. Essais cliniques

Malgré le niveau de preuve faible des études décrites ci-dessus, la phagothérapie est actuellement considérée comme une alternative thérapeutique très prometteuse. Des essais cliniques rigoureux multicentriques randomisés sont donc nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité de la phagothérapie dans des situations cliniques plus courantes et sur des effectifs significatifs. Le Tableau 3 synthétise les essais randomisés réalisés à ce jour.

Tableau 3 : Synthèse des essais cliniques randomisés évaluant la sécurité et l'efficacité de la phagothérapie

Référence	Type d'essai – Objectif principal	Protocole	Résultats principaux/secondaires
Rhoads 2009 (USA) (159)	Essai de phase I monocentrique, prospectif, randomisé en double aveugle, contrôlé contre placebo ; Approuvé par la FDA Evaluation de l'innocuité du cocktail WPP-201 (8 phages anti <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>) pour le traitement d'ulcères veineux de jambe (> 30 jours d'évolution)	Comparaison du traitement par bactériophages (application 1 fois/semaine grâce à un pansement spécifique pendant 12 semaines d'une suspension à 10 ⁹ PFU/mL) vs placebo 42 patients randomisés	<u>Résultat principal</u> : pas de différences significatives de survenue d'effets indésirables <u>Résultat secondaire</u> : pas de différence significative de guérison des plaies
Wright 2009 (Royaume Uni) (160)	Essai de phase I/II monocentrique, prospectif, randomisé, contrôlé, en double aveugle ; Approuvé par la MHRA Evaluation de l'efficacité et de l'innocuité du cocktail Biophage-PA (6 phages anti <i>P. aeruginosa</i>) pour le traitement d'otites chroniques	Comparaison du traitement par bactériophages (application unique de 10 ⁵ PFU de chaque phage) au placebo Suivi à J7, J21 et J42 : scores cliniques, charge bactérienne dans les prélèvements locaux 24 patients randomisés pour lesquels la sensibilité de la souche à au moins un des phages du cocktail a pu être vérifiée	<u>Résultats principaux</u> : amélioration clinique et diminution de la charge bactérienne significatives dans le groupe test Pas de différences significatives de survenue d'effets indésirables <u>Résultats secondaires</u> : Multiplication locale des bactériophages (x200 en moyenne)
Sarker 2016 (Bangladesh) (161)	Essai monocentrique, prospectif, randomisé en double aveugle, contrôlé contre placebo Evaluation de l'efficacité et de l'innocuité de deux cocktails de phages (NRC-T4-like et MicrogenColiProteus) anti <i>E. coli</i> pour le traitement des diarrhées aiguës (<48 h) chez les enfants (6-24 mois)	Comparaison du traitement par un des cocktails de bactériophages au placebo (administration 3 fois/jour pendant 4 jours) Suivi de l'évolution clinique (fréquence et volume des diarrhées etc.) 120 patients randomisés entre les trois groupes	<u>Résultats principaux</u> : Pas de différence d'amélioration clinique entre les patients traités par bactériophages et le groupe contrôle (rétrospectivement attribuée au manque de sensibilité des souches d' <i>E. coli</i> aux phages) et de survenue d'effets indésirables <u>Résultats secondaires</u> : Titres de phages dans les selles des patients traités plus importants que le groupe contrôle mais pas de multiplication)
Jault 2018 PHAGOBURN (multicentrique) (162)	Essai de phase I/II multicentrique, prospectif, randomisé, contrôlé, en double aveugle ; Approuvé par trois agences nationales du médicament	Comparaison du traitement par bactériophages (application quotidienne pendant 7 jours d'une suspension à 10 ⁶ PFU/mL dans des compresses) Prélèvement bactériologique quotidien pendant 7 jours (réponse bactériologique=évaluation semi-quantitative de la diminution de la charge bactérienne) puis suivi clinique pendant 21 jours Etude de la sensibilité des souches isolées des patients ayant reçu le traitement par bactériophages <i>a posteriori</i> 27 patients randomisés	<u>Résultats principaux</u> : Durée pour obtenir une réponse bactériologique plus longue dans le groupe phages que dans le groupe contrôle Pas de différences significatives de survenue d'effets indésirables <u>Résultats secondaires</u> : Instabilité des bactériophages dans le mélange pouvant expliquer le manque d'efficacité Résultats de sensibilité : résistance aux faibles doses de bactériophages des souches des patients avec échec microbiologique

Abréviations: FDA : Food and Drug Administration, MHRA : UK Medicines and Healthcare products Regulatory Agency

Le premier essai randomisé, contrôlé, en double aveugle de phase I approuvé par la FDA a permis d'examiner l'innocuité d'un cocktail de bactériophages anti *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* (WPP-201) administrés à des patients atteints d'ulcère chronique de la jambe (159). Il n'a pas été observé de différence dans l'apparition d'effets indésirables entre le groupe traité par phagothérapie et le groupe témoin. Il n'y avait également pas de différences d'évolution des plaies entre les groupes.

Un deuxième essai de phase I/II réalisé au Royaume-Uni évaluant le cocktail Biophage-PA dans le cadre du traitement d'otites chroniques à *P. aeruginosa* a démontré son efficacité supérieure à celle du placebo et son innocuité (160). Les bactériophages ont été détectés dans les prélèvements réalisés chaque semaine en moyenne pendant 23 jours après administration de la dose unique et la quantité moyenne de bactériophages retrouvée était deux cents fois supérieure à celle administrée démontrant une multiplication locale.

Un essai randomisé contre placebo à plus grande échelle a été effectué au Bangladesh pour tester deux cocktails de bactériophages administrés par voie orale pour le traitement de diarrhées aiguës chez des enfants (161). Aucune différence dans l'apparition d'effets indésirables n'a été observée par rapport au groupe contrôle. Cependant, cet essai n'a pas permis de montrer d'amélioration clinique en cas de traitement par l'un des deux cocktails, probablement par manque de sensibilité des souches d'*E. coli* responsables de ces infections (50% des souches isolées étaient sensibles au cocktail utilisé).

Enfin, le premier essai clinique multicentrique européen (approuvé par trois agences nationales de santé (France, Belgique, Suisse) randomisé en double aveugle de phase I/II (Phagoburn) a été réalisé entre 2015 et 2017 dans le but d'évaluer la tolérance et l'efficacité d'un cocktail de 12 phages anti *P. aeruginosa*, produits selon les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), pour le traitement d'infections cutanées des grands brûlés en comparaison au traitement de référence (sulfadiazine). Les résultats de cet essai ont été publiés en 2018 dans le journal *The Lancet Infectious Diseases* et ont montré une réduction significative de l'inoculum bactérien des plaies chez la moitié des patients traités par bactériophages (162). Cependant, le temps nécessaire pour observer cet effet était significativement plus long dans le groupe traité par bactériophages que dans le groupe de référence. Malheureusement, ces résultats sont entachés par un biais important de cette étude. En effet, les analyses de stabilité

en cours d'essai du cocktail de bactériophages ont montré que le préassemblage du cocktail, imposé par les agences nationales de santé avant l'essai, aurait entraîné une diminution importante de la stabilité des bactériophages sous forme de cocktail par rapport à celles phages conservés isolément (diminution du titre de 10^9 PFU/mL à 10^4 - 10^5 PFU/ml après 6 mois) et donc de la dose de bactériophages réellement administrée aux patients. Ces données ont entraîné la suspension de l'essai pendant 3 mois puis l'arrêt prématuré de cet essai. Au final, seulement 27 patients contre 125 initialement souhaités ont été inclus dans cette étude. Le nombre d'effets indésirables rapportés au cours du traitement par bactériophages était faible et non significativement différent de celui observé avec la sulfadiazine.

En conclusion, les quelques essais cliniques menés à ce jour incluaient trop peu de patients ou comprenaient des biais empêchant de conclure de manière satisfaisante sur l'effet thérapeutique des bactériophages. Plusieurs autres essais sont en cours ou en projet pour le traitement de différentes infections (infections urinaires, ostéo-articulaires, respiratoires etc.) (163). Abedon a récemment présenté une liste de critères à considérer pour permettre une production des bactériophages selon des standards de qualité élevés et d'informations à rapporter dans les essais cliniques modernes sur la phagothérapie dans le but d'améliorer l'interprétation des données et de faciliter leur transposition à la pratique clinique (164). Cet article pointe notamment l'importance d'une bonne caractérisation des bactériophages (spectre d'activité, analyse génomique), de la description des techniques de purification utilisées et des contrôles qualité effectués (dosage des endotoxines, titre des bactériophages, stabilité etc.) ainsi que d'une description précise des modalités thérapeutiques (sélection des bactériophages selon le profil de sensibilité de la souche, précisions sur la dose utilisée et fréquence d'administration) et d'évaluation de l'efficacité et tolérance des bactériophages.

4) Risque d'émergence de résistances aux bactériophages

a) Mécanismes de résistances

L'apparition de résistances aux bactériophages résulte de leur coévolution avec les bactéries. Différents mécanismes de résistance touchant les différentes étapes clés du cycle de réplication des bactériophages ont été décrits dans la littérature et synthétisés dans la revue de Labrie *et al* (165).

Tout d'abord, les bactéries peuvent développer des mécanismes entraînant l'inhibition de l'adsorption des bactériophages à leur surface par i) modification de leurs récepteurs suite à des mutations aléatoires, ii) synthèse de molécules masquant l'accès à ces récepteurs, iii) production d'une matrice extracellulaire (alginates, acide hyaluronique, lipopolysaccharide O ou polysaccharide capsulaire K) ou iv) production d'inhibiteurs compétitifs ayant une plus grande affinité pour les récepteurs que les bactériophages.

La présence de protéines transmembranaires des systèmes Sie (*Superinfection exclusion*) peut aussi empêcher l'entrée de l'ADN du bactériophage dans la bactérie. Cependant, les gènes codant ce type de protéines sont souvent retrouvés dans les bactériophages tempérés, suggérant qu'elles ont un rôle surtout dans l'inhibition de l'infection de la bactérie par un autre type de phage après insertion du prophage dans son génôme.

Après son insertion dans le cytoplasme bactérien, le génome viral peut également être dégradé avant de pouvoir être répliqué. Différents mécanismes de protection de l'ADN viral existent pour empêcher l'action des enzymes de restriction bactériennes et permettre au bactériophage de se répliquer dans la bactérie. Cependant, de nombreux exemples d'adaptation des enzymes de restriction bactériennes permettent de contourner ces mécanismes de protection de l'ADN viral. Par ailleurs, il existe un système immunitaire adaptatif chez les bactéries, appelé système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas qui permet la reconnaissance du génome viral grâce à de petits ARN guidant l'action d'une nucléase Cas pour le détruire.

Enfin, les bactéries sont capables d'échapper à une infection par bactériophages grâce à l'activation de « systèmes d'avortement de l'infection » ou systèmes Abi (*Abortive infection*) ciblant des mécanismes clés de la réplication bactérienne (réplication, transcription, traduction) et entraînant la mort de la bactérie.

b) Emergence de résistance aux bactériophages dans le cadre de la phagothérapie

L'émergence de résistances bactériennes aux bactériophages est fréquente et rapide *in vitro* (fréquence d'environ 10^{-7}) (166). L'apparition de mutants résistants a été également documentée *in vivo* dans des études avec des modèles animaux, notamment au cours du traitement d'infections digestives, mais elle est beaucoup moins rapide et fréquente qu'*in vitro* (167). Ces études ont par ailleurs permis de montrer que le coût biologique de cette

résistance était très important pour la bactérie et avait des conséquences sur leur fitness et leur pouvoir infectieux. En effet, certaines des cibles des bactériophages qui peuvent faire l'objet de modifications en cas de résistance sont également des facteurs de virulence (capsule, lipopolysaccharide (LPS), pili). Oechslin *et al.* ont notamment pu montrer que différents mutants de *P. aeruginosa*, devenus résistants aux bactériophages après exposition *in vitro* dans un caillot de fibrine, entraînaient une infection moins importante des valves cardiaques chez la souris que la souche sauvage en raison de mutations dans les gènes impliqués dans la rétraction des pili bactériens ou dans la synthèse du LPS (143). L'apparition de résistances aux bactériophages peut également être associée à une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques par perte de la capsule, dysfonctionnement des pompes à efflux etc. (167).

L'acquisition de résistances chez l'Homme a également été documentée dans des études en Europe de l'Est lors d'utilisation de bactériophages en monothérapie. La fréquence d'acquisition de résistance était très variable selon le pathogène (17% pour *S. aureus* versus 85% pour *E. coli*) (168). Cependant, à ce stade, il est difficile de savoir si l'utilisation de la phagothérapie sera associée à une augmentation des résistances aux bactériophages, comme cela a été et est le cas pour les antibiotiques, et qu'elle en sera la fréquence. En effet, le spectre étroit des bactériophages laisse supposer qu'en cas d'apparition de résistances, elles concerneront un faible nombre de souches bactériennes (97). Par ailleurs, il faut noter que le problème de la résistance aux antibiotiques est notamment lié aux transferts horizontaux entre bactéries de gènes de résistance via des supports génétiques spécifiques, qui, à ce jour, n'existe pas pour la résistance aux bactériophages.

Afin d'éviter l'émergence de résistances, les bactériophages peuvent être utilisés sous forme d'assemblages ou de « cocktails » pour élargir le spectre d'activité et améliorer l'efficacité en augmentant le nombre de cibles bactériennes (diminution de la probabilité de sélection des mutants résistants à plusieurs bactériophages). L'élargissement du spectre d'activité permet en théorie d'envisager une administration des cocktails de bactériophages sous forme d'un traitement probabiliste, sans connaître forcément le profil de sensibilité de la souche bactérienne. Néanmoins, les études portant sur un panel large de souches cliniques montrent qu'il existe régulièrement des souches présentant des profils de non sensibilité à certains de ces cocktails. Ainsi, les données des différentes études détaillées précédemment dans cette

thèse suggèrent que la phagothérapie devrait relever du champ de la médecine personnalisée avec une sélection des bactériophages en testant de larges collections et une adaptation de la composition de l'assemblage des bactériophages à chaque souche clinique (152,158).

TRAVAIL
PERSONNEL

ARTICLE

Evaluation of the efficacy of an assembly of three bacteriophages alone or associated to antibiotics on *Staphylococcus aureus* embedded in biofilm or internalized in osteoblasts

Camille KOLENDA^{1,2,6}, Jérôme JOSSE^{1,6}, Mathieu MEDINA³, Cindy FEVRE³, Sébastien LUSTIG^{4,6},
Tristan FERRY^{1,5,6}, Frédéric LAURENT^{1,2,6,7,8}

1. CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

2. Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, France

3. Pherecydes Pharma, Romainville, France

4. Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

5. Service de Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

6. Centre Interrégional de Référence des Infections Ostéo-Articulaires complexes (CRIOAc Lyon), Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

7. Centre National de Référence des Staphylocoques, Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

8. Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France

Synopsis

Staphylococcus aureus is responsible of difficult-to-treat bone and joint infections (BJI) because of its ability to form biofilm, to be internalized and persist inside osteoblastic cells. Recently, phage therapy has emerged as a promising therapy to improve the management of chronic BJI. In the present study, we evaluated the efficacy of an assembly of three bacteriophages against *S. aureus* HG001 in a model of biofilm formation and a model of osteoblasts infection, alone or in association with vancomycin or rifampicin.

The activity of bacteriophages against biofilm-embedded *S. aureus* was dose-dependent. Synergistic effects were observed when bacteriophages were combined to antibiotics at the lowest concentrations, with no significant bactericidal activity in monotherapy. In the human osteoblast infection model, we were able to show that phage penetration into osteoblasts was only possible when the cells were infected, suggesting a *S. aureus* dependent Trojan horse mechanism. The intracellular inoculum in osteoblasts treated with bacteriophages or vancomycin was significantly higher than in cells treated with lysostaphin, used as control condition of rapid killing of bacteria released in the extracellular media after death of infected cells and absence of intracellular activity. These results suggest that bacteriophages are probably both i) inactive in the intracellular compartment and ii) unable to kill all bacteria released after cell lysis into the extracellular medium fast enough to prevent them from reinfecting other osteoblasts. Conversely, the intracellular inoculum recovered from cells treated with vancomycin+bacteriophages was significantly lower than the one inside cells treated with vancomycin or bacteriophages alone, suggesting that this combination allowed a better control of released bacteria in the extracellular media. Finally, bacteriophages did not increase the activity of rifampicin in this model.

Introduction

Staphylococcus aureus is the first causative agent of bone and joints infections (BJI) and is responsible of particularly difficult to treat infections because of its wide panel of virulence factors promoting chronic evolution of these infections.^{1–3} Biofilm formation plays a key role in the pathophysiology of staphylococcal chronic BJI and limitation of the action of antibiotics.^{4,5} *S. aureus* is also able to invade and persist within bone cells, especially osteoblasts.⁶ The poor diffusion in osteoblastic cells and the low activity of some antibiotics currently used to treat BJI on these sanctuarized bacteria contribute to the bacterial persistence.⁷ Despite an appropriate antibiotic treatment and surgical procedure, the important rate of relapsing infections shows that new therapeutic strategies are urgently needed. Recently, phage therapy has notably re-emerged as a promising alternative therapy to improve the management of BJI.⁸

Bacteriophages are viruses which specifically infect bacteria. They were discovered in 1917 by Felix d'Hérelle and were considered in the following years as an interesting antimicrobial therapy.⁹ However, their use was quickly abandoned in Western Europe following the discovery of antibiotics while they remained a popular treatment during the 20th century in Eastern Europe, among others for patients with BJI.¹⁰ In the last decades, three studies using animal models have highlighted the potential of bacteriophages in combination with antibiotics to prevent and treat *S. aureus* BJI.^{11–13} Very recently, with the approval of the French National Agency for Medicines and Health Products Safety, bacteriophages have also been used in humans as a salvage therapy for severe periprosthetic joint infections.^{14,15}

Several studies have demonstrated the particular interest of bacteriophages in this context due to their activity against biofilm.^{16–18} Indeed, because of the high density of bacteria, the rate of phage multiplication inside biofilm is important. Moreover, susceptibility of bacteria to bacteriophages is not compromised by the low metabolic states of bacteria found in the deeper layers of the biofilm whereas it significantly impacts the activity of antibiotics.¹⁹ The production of enzymes able to degrade the biofilm matrix also favors their activity, as well as those of the antibiotics used in association to bacteriophages.²⁰ Conversely, the activity of bacteriophages against the second reservoir of sanctuarized bacteria, formed by the bacteria internalized in osteoblasts, has until now never been explored.

In the present study, we evaluated the activity of an assembly of three bacteriophages used in a clinical case reported by Ferry et al.¹⁴ against a *S. aureus* strain. To this end, we tested the bacteriophages alone or associated to antibiotics classically used to treat BJI, i.e. vancomycin and rifampicin, in a model of biofilm formation and a model of osteoblast infection.

Materials and Methods

Bacterial strains and bacteriophages

The methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain HG001, previously used by Valour et al.⁷ as a reference strain to test the efficiency of antibiotics against intracellular staphylococci, was included in this study to assess the bactericidal activity of bacteriophages. The *S. aureus* strain SH50-2 was used for bacteriophages titrations. Before each experiment, all strains were grown on Columbia blood agar (COS, BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) for 24 hours at 36°C. Three colonies were then used to inoculate brain heart infusion medium (BHI, BioMérieux) before incubation overnight. The strain HG001 had minimum inhibitory concentrations (determined by microdilution (CLSI)) of 1.5 mg/L and 0.016 mg/L for vancomycin and rifampicin respectively.

Three bacteriophages, PP1493, PP1815 and PP1957, produced and purified by Pherecydes Pharma (Romainville, France) were used and assembled before each experiment. When needed, bacteriophages titration was performed using a spot test assay. Bacteriophages suspensions were diluted 10-fold serially in lysogeny broth (LB Lennox, Fisher Scientific, Hampton, NH, United States) (from 10⁻¹ to 10⁻⁸) and 5 µL of these dilutions were spotted on a special agar prepared immediately before use mixing 25 mL of LB 0.75% agar medium and 2 mL of an exponential culture of *S. aureus* SH50-2 (OD_{600nm}=0.4-0.8). After 24h of incubation at 36°C, the number of Plaque Forming Units (PFU) was visually determined.

***S. aureus* HG001 sensitivity to bacteriophages**

S. aureus HG001 sensitivity to the assembly of the three bacteriophages was evaluated thanks to two complementary methods. First, the efficiency of plating (EOP) score was determined calculating the ratio between the titer of bacteriophages obtained with the HG001 strain divided by the titer obtained with the SH50-2 reference strain. Second, the growth inhibition of *S. aureus* by bacteriophages in liquid medium was assessed culturing bacteria in a 96-well plate at a starting concentration of 10^7 CFU/mL, with or without phage at two concentrations (multiplicity of infection (MOI) of 1 or 10 bacteriophages per bacteria). The bacterial growth at 36°C was monitored measuring the optical density at 600nm (OD_{600nm}).

Assessment of bacteriophages bactericidal activity against biofilm-embedded *S. aureus* HG001

An overnight culture of *S. aureus* HG001 in liquid BHI (BD, Germany) was adjusted to OD_{600nm}=1.0 and were then diluted 100-fold in BHI. Then, a 96-well polystyrene plate (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) was inoculated with 100 µL of bacterial suspension per well and incubated at 36°C for 24h to allow mature biofilm formation. Supernatants were removed, the biofilm was rinsed three times with saline water and further incubated for 24h with 200 µL of antibiotic and/or bacteriophages. A range of 3 concentrations of antibiotics (corresponding to the MIC of the strain, 10 MIC and the usual intraosseous concentration reached in humans when using standard therapeutic dosages⁷) and 4 concentrations of bacteriophages (10^5 - 10^8 PFU/mL) were used to assess potential dose effects. The biofilm was again rinsed before being re-suspended in 100 µL of PBS by scraping the wells with sterile pipette tips followed by 10 min of sonication. The residual viable inoculum was determined by plating 10-fold serial dilutions of the resulting bacterial suspensions on COS agar.

Intracellular infection of osteoblasts and assessment of bacteriophages activity against internalized *S. aureus* HG001

Bacteriophages activity against internalized *S. aureus* HG001 was assessed in an *in vitro* model of osteoblast infection adapted from a previously published protocol.⁷ All cell culture reagents were purchased from GIBCO™ (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, United States). MG63 osteoblastic cells (ATCC® CRL-1427TM, LGC standard, Molsheim, France) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (culture medium) and 100 U/mL penicillin and 100 mg/L streptomycin at 36°C in a 5% CO₂ atmosphere. They were passaged once a week and used up to passage 20 after thawing. Prior to infection experiments, cells were seeded at 50 000 cells per well into 24-well tissue culture plates (Falcon, Le Pont de Claix, France) and incubated during 48 hours in culture medium with antibiotics.

Intracellular infection of MG63 cells was performed using a bacterial suspension whose concentration was determined as follows. The day before the infection of osteoblastic cells, 2 mL of a bacterial overnight culture in BHI were centrifuged and the pellet was suspended in 10 ml of cell culture medium without antibiotics. Serial dilutions of this suspension were plated on trypticase soy agar (TSA, bioMérieux) using an easySpiral® device (Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) for bacterial enumeration. Meanwhile, the bacterial suspension was kept overnight at 4°C. The next day, this suspension was standardized at a MOI of 10 bacteria/cell and added to the osteoblastic cells culture wells for 2h at 36°C to allow bacterial internalization. Cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and were treated with culture medium containing 10 µg/mL lysostaphin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) to kill the remaining extracellular bacteria. After 1 h, the cells were washed twice and the cells of three wells were lysed in sterile water to determine the number of internalized bacteria at this point, defined as time zero. Then, incubation was carried on for 24h with 1 mL of culture medium containing bacteriophages and/or antibiotic. Two concentrations of bacteriophages were used: 10⁹ PFU/mL and 10⁷ PFU/mL. The antibiotics were used at their usual intraosseous concentration (6 mg/L for both antibiotics).⁷ After 24h, the supernatants were removed in order to perform bacteriophages titrations. Then, the cells were washed twice with PBS, treated with citric buffer (40 mM of citric acid in PBS, pH=3) for 2 minutes in order to inactivate any phage particles remaining on the surface of the cells and washed twice

again.²¹ The number of viable intracellular bacteria was determined after lysis of the cells. Bacteriophages titrations were performed in these lysates.

Electronic microscopy analysis

After 24h of incubation as described above, cells were washed and fixed in 2% glutaraldehyde. They were washed three times with a buffered solution containing 1 volume of saccharose 0.4M and 1 volume of cacodylate 0.2 M (pH=7.4) for 1 h at 4°C, and postfixed with a solution containing 1 volume of osmium 2% and 1 volume of cacodylate 0.3 M (pH=7.4) for 1h at 4°C. Cells were then dehydrated using an ethanol gradient (5 minutes in ethanol 30%, 50%, 70%, and 95%, and 3 times for 10 minutes in absolute ethanol). Impregnation was performed with an epon mix. Inclusion was obtained by polymerization at 60°C for 72h. Ultrathin sections (approximately 70 nm thick) were cut on a UC7 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) mounted on 200 mesh copper grids coated with 1:1,000 polylysine, stabilized for 1 day at room temperature (RT) and, contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined with a 1400-JEM transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Each experiment was performed three times independently in triplicates. For cellular experiments, variables were compared using a nonparametric two-sided Mann-Whitney U test. A p-value < 0.05 was considered significant. For biofilm eradication data analysis, remaining viable inocula after 24h of treatment, initially determined in CFU/mL, were log transformed. Data were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni post tests were used to compare the effects of antibiotics, bacteriophages and of combinations. An interaction was defined as being additive if the effect of the combination antibiotic/bacteriophages was significantly superior ($p < 0.05$) to that of one of the antimicrobial agents used alone. An interaction was defined as being synergistic if the effect of the combination was significantly superior to that of both agents used alone. All analyses were performed using Prism software (GraphPad, San Diego, USA).

Results

Bacteriophages are strongly active on planktonic *S. aureus* HG001

The EOP score of the assembly of the three bacteriophages against *S. aureus* HG001 was 0.22. The closer this score is to 1, the more effective the phages are. In our case, the score indicated that the bacteriophages were strongly active on *S. aureus* HG001 ($\text{EOP} \geq 0.1$).²² The bacteriophages also completely inhibited the growth of bacteria in liquid medium at both tested MOI (Figure 1).

Bacteriophages are active on biofilm-embedded *S. aureus* HG001 in a dose-dependent manner and can increase the activity of antibiotics

S. aureus HG001 biofilm was exposed for 24h to the assembly of the three bacteriophages at different concentrations (from 10^5 to 10^8 PFU/mL). Their bactericidal activity was dose-dependent (Figure 2, white bars). The maximum reduction in viable bacteria count was observed for the highest concentrations of bacteriophages (10^7 and 10^8 PFU/mL) with a reduction of the viable inoculum of 99.92 % and 99.97 % respectively compared to the untreated condition ($p < 0.001$). Exposure to lower concentrations had a moderate bactericidal effect at 10^6 PFU/mL (reduction of 96.02 % of the inoculum, $p < 0.001$), or no significant effect at 10^5 PFU/mL.

The association of bacteriophages with vancomycin was additive or synergistic (Figure 2A) for almost all combined conditions. In addition, as rifampicin was more active than vancomycin on biofilm-embedded *S. aureus*, additive or synergistic effects between rifampicin and bacteriophages were observed only when these agents were combined at the lowest concentrations (Figure 2B).

Bacteriophages can be internalized in infected MG63 osteoblastic cells but are not active against intracellular *S. aureus* HG001

In order to investigate the capacity of bacteriophages to control the intracellular *S. aureus* infection, MG63 osteoblastic cells were infected with HG001 and then treated with bacteriophages and/or antibiotics (Figure 3). In absence of treatment, bacteria could escape from infected cells, multiply in cells or in the extracellular media before being re-internalized

in other cells. Lysostaphin is an antimicrobial peptide which can quickly destroy bacteria released from infected cells in the extracellular media, but which has no intracellular activity.²³ A significant decrease of the intracellular inoculum was observed after 24h of exposition to rifampicin when compared to lysostaphin ($p < 0.0001$). The treatment with bacteriophages allowed obtaining an intracellular inoculum significantly inferior to that obtained in the untreated condition. However, it was significantly superior to that recovered in cells treated with lysostaphin ($p < 0.0001$), suggesting that bacteriophages had no intracellular activity and that their activity in the extracellular media was too slow to prevent bacteria released from infected cells from re-infecting other cells. The inoculum found in cells treated with bacteriophages at 10^7 PFU/mL was significantly more important than the one in cells exposed to bacteriophages at 10^9 PFU/mL ($p = 0.04$), meaning that less bacteria were re-internalized when the highest concentration of bacteriophages was used and that the control of the extracellular bacteria by bacteriophages was concentration-dependant. In our model, activities of bacteriophages and vancomycin were not significantly different. Of note, the intracellular inoculum recovered in cells treated with the association of vancomycin and bacteriophages was significantly less important than that in cells treated with vancomycin or bacteriophages alone ($p = 0.0004$ and 0.0006 respectively), and not significantly different from that in cells treated with lysostaphin. This result suggests that the combination of vancomycin and bacteriophages allowed a better control of released bacteria by infected cells in the extracellular media but that both agents had no intracellular activity, like lysostaphin. In addition, bacteriophages did not increase the intracellular activity of rifampicin in this model ($p = 0.49$).

In order to investigate the replication of bacteriophages and their penetration inside osteoblasts, titrations were performed in cellular supernatants and MG63 lysates after 24h of treatment (Figure 4A and 4B). The titers in the supernatant increased when bacteriophages were applied on infected cells without antibiotics ($p = 0.0006$ and 0.02 for bacteriophages used at 10^7 and 10^9 PFU/mL respectively), likely due to the replication of bacteriophages in bacteria released after the lysis of the infected cells. This increase was not observed when bacteriophages were combined to rifampicin. This is probably explained by its bactericidal activity which prevents the replication of bacteriophages by rapidly killing bacteria. Interestingly, we recovered a mean amount of bacteriophages of $7.9 \cdot 10^5$ and $3.6 \cdot 10^6$ PFU/mL

in lysates of infected cells treated with 10^7 and 10^9 PFU/mL respectively, significantly superior to the titers in lysates of non-infected cells treated with the same concentrations of bacteriophages, which were close to the detection limit of the quantification method ($2 \cdot 10^3$ PFU/mL). The penetration of bacteriophages in infected osteoblastic cells was less important when combined to antibiotics, suggesting that the penetration happens when bacteria released in the extracellular media re-infect cells. This hypothesis is also supported by electronic microscopy observations showing numerous bacteriophages around bacteria in infected osteoblasts treated with bacteriophages (Figure 5), and not in non-infected osteoblasts also exposed to bacteriophages.

Discussion

Treatment of *S. aureus* BJI is an important issue because these infections frequently evolve into chronic and treatment-refractory forms despite appropriate surgical management and prolonged antimicrobial therapy. Specific bacterial phenotypes, including intracellular and biofilm-associated lifestyles, impairing the action of immune cells and of most antimicrobials, lead to the sanctuarization of bacteria, responsible for recurrent infections. To face these clinical failures, phage therapy has been regaining interest as a potential alternative strategy.⁸ Local injection of an assembly of three bacteriophages has recently been authorized by the French National Agency for Medicines and Health Products Safety to treat a relapsing *S. aureus* chronic prosthetic-joint infection and was associated to a clinical success.¹⁴ In the present study, we evaluated the activity of these bacteriophages against both persistence phenotypes, namely biofilm-embedded and intracellular bacteria. We tested various concentrations of bacteriophages and compared their efficacy when used alone or associated with antibiotics currently used to treat BJI (rifampicin and vancomycin). The use of rifampicin is of particular interest in this context due to its intracellular and anti-biofilm activity whereas vancomycin is conversely poorly active on these bacterial reservoirs.^{7,24}

Our results showed that the activity of bacteriophages against biofilm-embedded staphylococci was concentration dependent and that they were strongly active from 10^7 PFU/mL. The combination of the assembly of bacteriophages with antibiotics used at low

concentrations was synergistic, while they had no or only low bactericidal activity at these concentrations when used alone. This synergistic effect is noteworthy in the context of BJI treatment. Because of poor diffusion of antibiotics, their concentration in some locations of the bone can be low and the association with bacteriophages in these situations could contribute to increase their activity. The antibiofilm activity of bacteriophages has been previously described for a wide panel of Gram positive or negative bacteria in different *in vitro* or *in vivo* models of biofilm related infections.²⁵ Interestingly, the reduction of the viable inoculum after 24h of exposition observed in the present study was much greater (reduction of 3 to 4 log₁₀ CFU/mL) than in other studies based on similar *S. aureus* biofilm models using lower doses of bacteriophages.^{18,26,27} Our data corroborate those of previous studies showing that bacteriophages can enhance the activity of antibiotics.^{16–18,27} Of note, three of these studies also highlighted that the biofilm removal effect was influenced by the sequential use of these antimicrobial agents and demonstrated that the antibiofilm activity was better if bacteriophages were applied before antibiotics.^{16–18} However, further studies involving animal models are needed to confirm *in vivo* these *in vitro* data.

In the present study, we also investigated the bactericidal activity of the assembly of the three bacteriophages against *S. aureus* HG001 after internalization in non professional phagocytic cells, namely osteoblasts. Bacteriophages titrations in cellular lysates as well as electronic microscopy observations of uninfected osteoblasts treated with bacteriophages highlighted the absence of bacteriophages in non-infected cells treated with bacteriophages. Conversely, when osteoblasts were concomitantly infected by *S. aureus* and exposed to bacteriophages, numerous intracellular bacteriophages were detected, suggesting that they were able to get inside cells, likely using *S. aureus* as a Trojan horse. Nevertheless, they were inactive in the intracellular compartment. Exposition of infected cells to bacteriophages alone did not allow a significant reduction of the intracellular inoculum. While the association of bacteriophages to rifampicin did not show interest because rifampicin has a high extracellular and intracellular activity, the combination of bacteriophages to vancomycin was synergistic. This combination allowed the increase of the bactericidal activity of both agents in the extracellular media. Only two other studies have evaluated the intracellular activity of bacteriophages and showed contradictory results. Zhang et al. claimed that the anti-*S. aureus* vB_SauM_JS25 bacteriophage was able to penetrate into mammary epithelial cells and was able to reduce

the intracellular inoculum.²¹ However, the authors did not compare the activity of this bacteriophage to that of an antimicrobial agent only active against extracellular bacteria such as lysostaphin. Thus, it is difficult to affirm that the decrease of the intracellular inoculum after exposition to bacteriophages compared to the untreated condition was due to the intracellular activity of bacteriophages and not to the natural decrease of the intracellular bacteria in such cells. This would have deserved to be evaluated treating cells with lysostaphin. In another study, Kaur *et al.* showed that the bacteriophage MR-5 did not impact the natural intracellular killing of *S. aureus* by macrophages. Interestingly, the adsorption of this bacteriophage onto viable bacteria before applying them to infected macrophages allowed a reduction of the intracellular bacterial inoculum.²⁸ The authors assumed, like us in the present study, that bacteriophages could be shuttled inside macrophages thanks to bacteria.

The absence of intracellular activity of bacteriophages in our cellular model can be due to two types of phenomena. First, as the bactericidal effect of bacteriophages requires bacterial multiplication, their intracellular activity is possibly influenced by dormancy of bacteria inside osteoblasts. There are currently no available data in literature describing the multiplication and metabolism activity of *S. aureus* inside osteoblasts, which likely varies from one bacterial strain to another. Thus, Rollin *et al.* showed using another type of nonprofessional phagocytic cells, endothelial cells, that intracellular fate of *S. aureus* varied during the course of the same experience from one cell to another between rapid bacterial proliferation leading to cell lysis and a prolonged bacterial dormancy.²⁹ Moreover, the low intracellular pH may also affect the activity of bacteriophages.³⁰ Dupieux *et al.* previously reported the influence of acid pH on the intracellular activity of some antibiotics in osteoblasts, namely daptomycin and oxacillin.³¹ The concomitant use of alkalinizing agents (such as chloroquine, used to increase the activity of antibiotics during the treatment of infections caused by an intracellular bacteria, *Coxiella burnetii*) would deserve to be evaluated to determine whether it could allow restoring the intracellular activity of bacteriophages.³²

In conclusion, we showed that the bacteriophages tested were highly active against *S. aureus* in mature biofilm but had no activity against bacteria internalized in osteoblasts. Our results suggest that they could be an interesting adjuvant therapy for the treatment of *S. aureus* BJI, particularly to increase vancomycin activity. Additional studies using animal models of BJI and

well-conducted clinical trials are needed to further evaluate phage therapy and its positioning in the management of these infections.

Acknowledgments

The authors thank Elisabeth Errazuriz-Cerda and the CIQLE team (Lyon, France) for the preparation and the observation of samples by transmission electron microscopy.

Funding

Pherecydes Pharma has provided the bacteriophages used in this study.

Transparency declaration

Cindy Fevre and Mathieu Medina, who provided their expertise during this study, are employed by the commercial company Pherecydes Pharma.

Figures

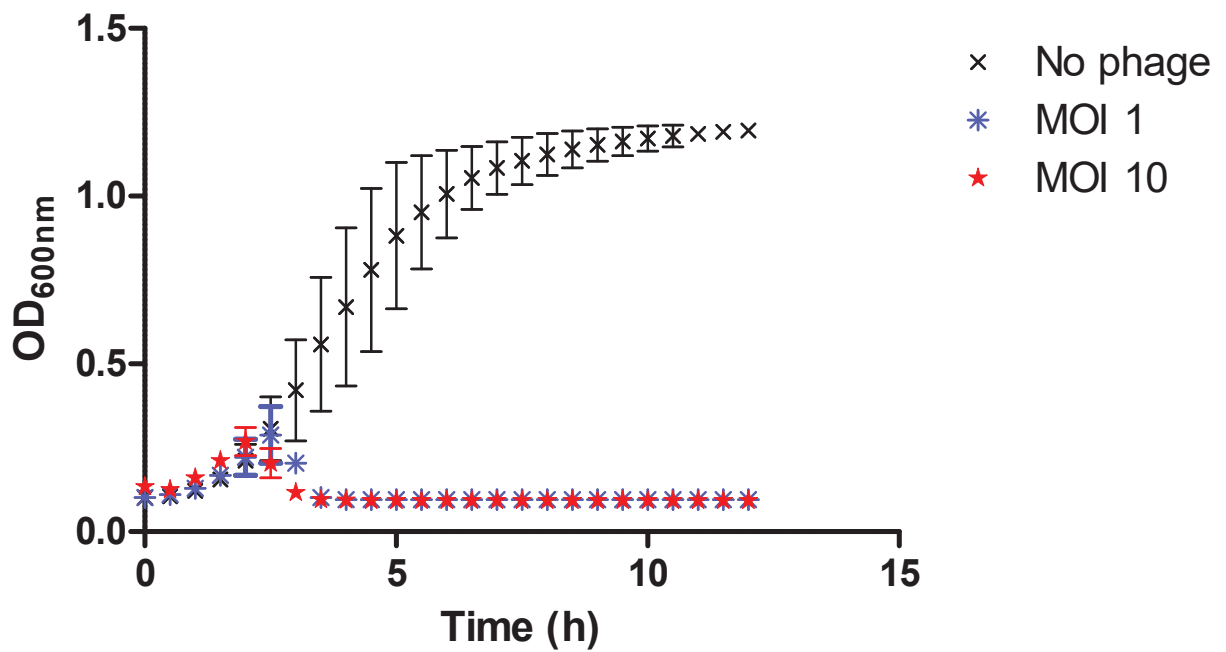
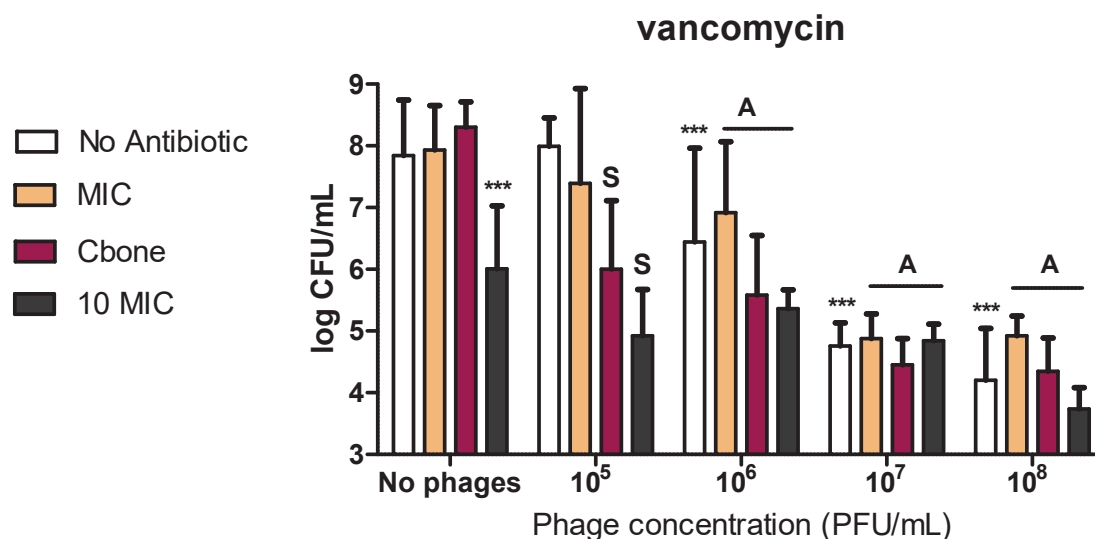


Figure 1: *S. aureus* HG001 growth inhibition by the assembly of three bacteriophages in liquid LB medium.

The growth inhibition of a bacterial inoculum of 10^7 CFU/mL was assessed in presence of bacteriophages at two concentrations (multiplicity of infection (MOI) of 1 or 10 bacteriophages per bacteria).

A



B

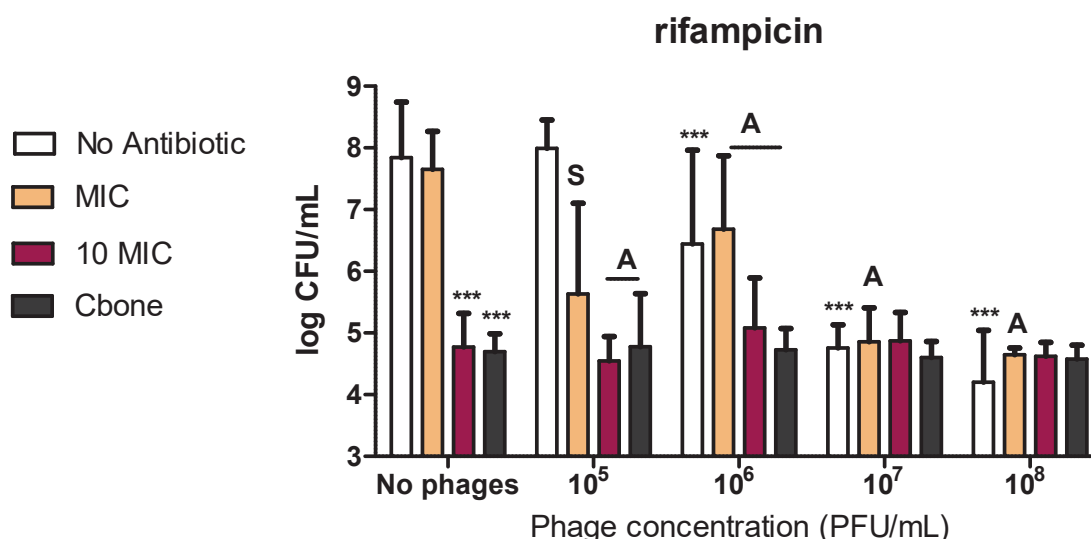


Figure 2: Effect of a 24 hours exposure of preformed 24 hours old *S. aureus* HG001 biofilm to bacteriophages, alone or combined to antibiotics (vancomycin (A) or rifampicin (B)) on viable bacteria counts.

Antibiotics were used at the following concentrations: 1.5 mg/L (MIC), 6 mg/L (Cbone=4xMIC) and 15 mg/L (10xMIC) for vancomycin and 0.016 mg/L (CMI), 0.16 mg/L (10xMIC) and 6 mg/L (Cbone=375xMIC) for rifampicin.

For monotherapy conditions, significant variations of the viable bacteria counts after 24 hours of treatment compared to untreated condition are denoted by *** ($p < 0.001$).

For bitherapy conditions, significant (2-way ANOVA, $p < 0.05$) synergistic (S) and additive (A) interactions have been indicated.

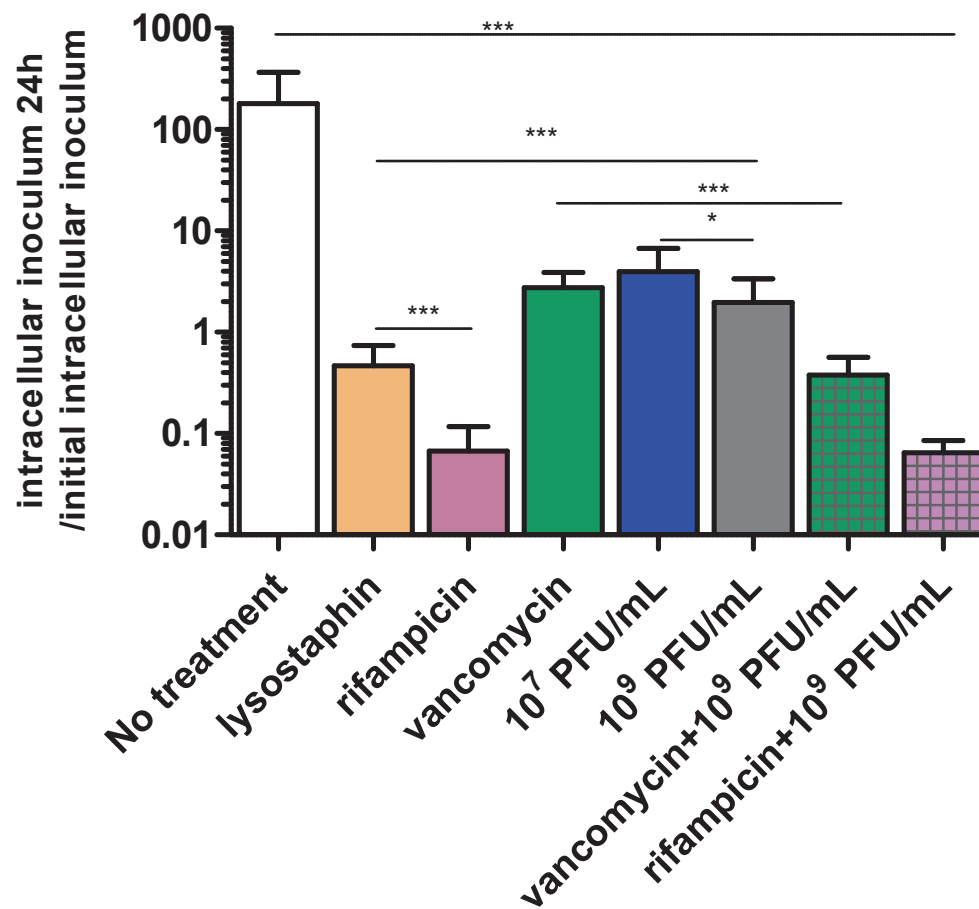


Figure 3: Intraosteoblastic inoculum variation after 24 hours of exposition to bacteriophages and/or antibiotics.

The efficacy of the different treatments against internalized HG001 *S. aureus* (ratio between the intracellular inoculum after 24 hours of treatment and the initial intracellular inoculum) were compared using the Mann-Whitney U-test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

(* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$; *** , $p < 0.001$)

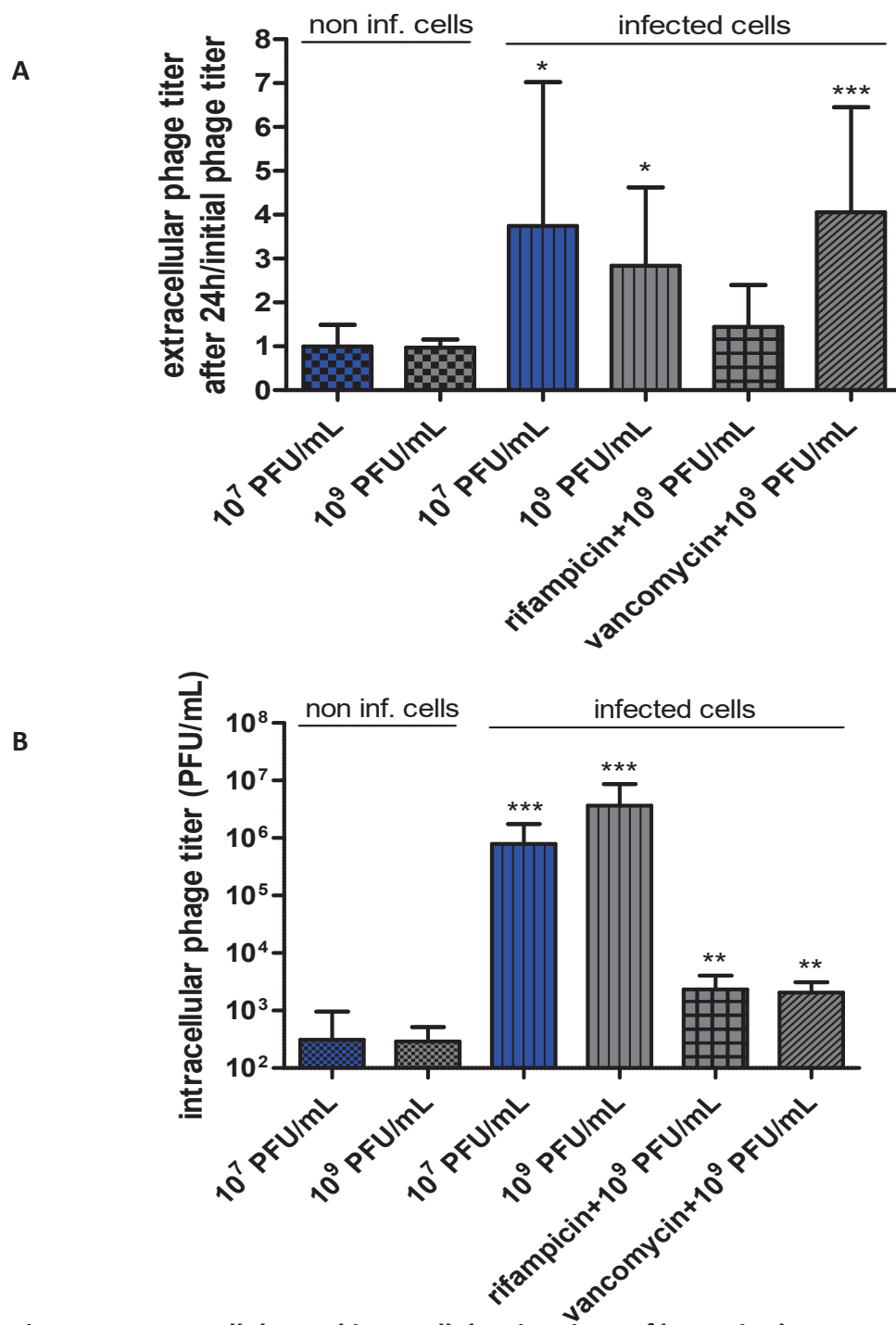


Figure 4 : Extracellular and intracellular titrations of bacteriophages

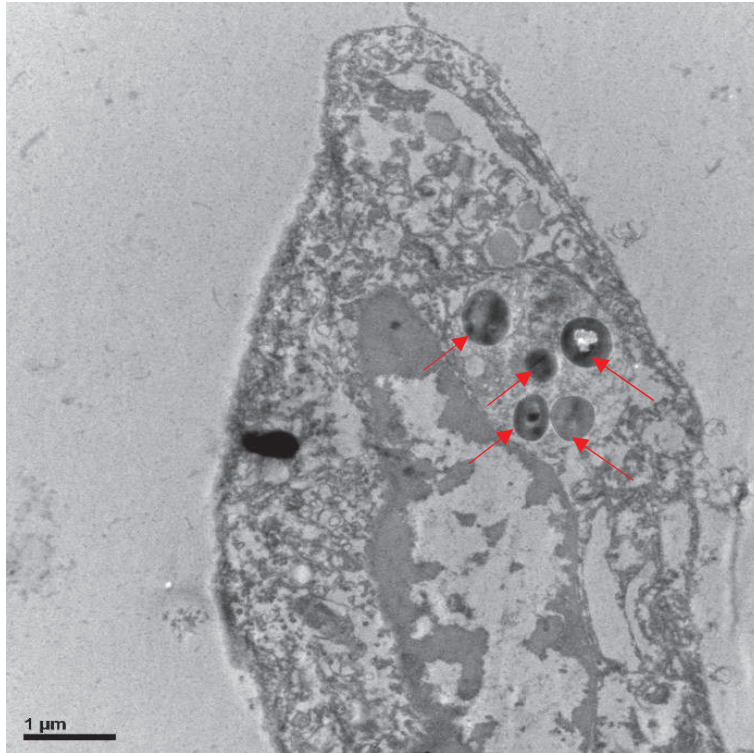
A. Extracellular bacteriophages titers.

The variation of the bacteriophage titers in the osteoblastic culture supernatants of non-infected and infected cells was assessed using the ratio between the bacteriophage titer after 24 hours and the initial bacteriophage titer. Significant variations of the ratio compared to the control condition (same concentration of bacteriophages applied to non-infected cells) are denoted by * ($p < 0.05$) and *** ($p < 0.001$).

B. Intracellular bacteriophages titers.

Significant variations of the intracellular titre compared to the control condition (same concentration of bacteriophages applied to non-infected cells) are denoted by ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

A



B

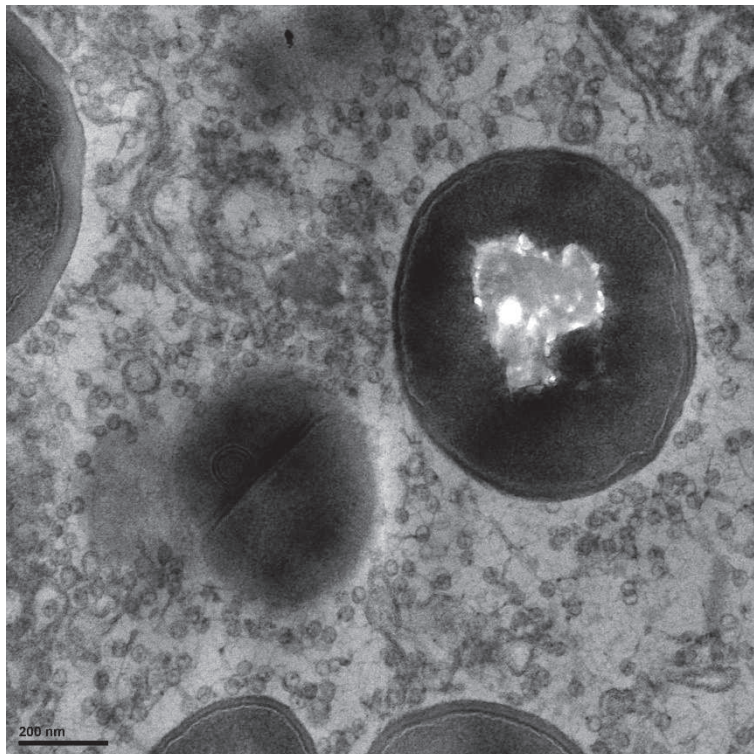


Figure 5 : Electronic microscopy observations of MG63 osteoblasts infected by *S. aureus* HG001 and treated during 24 hours with bacteriophages

A. Infected MG63 osteoblastic cell. *S. aureus* in a vacuole are indicated by arrows.

B. Zoomed view of the picture in A. Bacteriophages surrounding *S. aureus*.

References

1. Ferry T, Perpoint T, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in *Staphylococcus aureus* and their involvement in clinical syndromes. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 7: 420–8.
2. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhav A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet* 2016; 387: 386–94.
3. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364: 369–79.
4. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol* 2014; 9: 987–1007.
5. Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 47.
6. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5.
7. Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, et al. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 2029–36.
8. Akanda ZZ, Taha M, Abdelbary H. Current review - The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *J Orthop Res* 2018; 36: 1051–60.
9. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 437–51.
10. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect* 2008; 38: 426–30.
11. Kishor C, Mishra R, Saraf S, Kumar M, Srivastav A, Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Indian J Med Res* 2016; 143: 87.
12. Kaur S, Harjai K, Chhibber S, Becker K. *In vivo* assessment of phage and linezolid based implant coatings for treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) mediated orthopaedic device related infections. *PLoS ONE* 2016; 11: e0157626.

13. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95: 117–25.
14. Ferry T, Leboucher G, Fevre C, et al. Salvage ‘DAIR’ (debridement, antibiotics and implant retention) with local injection of a selected cocktail of bacteriophages: is it an option for an elderly patient with relapsing *S. aureus* prosthetic-joint infection? *Open Forum Infect Dis* 2018; 5.
15. Ferry T, Boucher F, Fevre C, et al. Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73: 2901–3.
16. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PloS One* 2017; 12: e0168615.
17. Tkhilaishvili T, Lombardi L, Klatt A-B, Trampuz A, Di Luca M. Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 52: 842–53.
18. Kumaran D, Taha M, Yi Q, et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol* 2018; 9: 127.
19. Pearl S, Gabay C, Kishony R, Oppenheim A, Balaban NQ. Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol* 2008; 6: e120.
20. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 357–62.
21. Zhang L, Sun L, Wei R, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* control by virulent bacteriophages within MAC-T bovine mammary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61.

22. Green SI, Kaelber JT, Ma L, Trautner BW, Ramig RF, Maresso AW. Bacteriophages from ExPEC reservoirs kill pandemic multidrug-resistant strains of clonal group ST131 in animal models of bacteremia. *Sci Rep* 2017; 7: 46151.
23. Kim J-H, Chaurasia AK, Batool N, Ko KS, Kim KK. An alternative enzyme protection assay to overcome the drawbacks of gentamicin protection assay for measuring entry and intracellular survival of *Staphylococci*. *Infect Immun* 2019
24. Saginur R, Stdenis M, Ferris W, et al. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 55–61.
25. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 85–99.
26. Morris J, Kelly N, Elliott L, et al. Evaluation of bacteriophage anti-biofilm activity for potential control of orthopedic implant-related infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Surg Infect* 2018; 20: 16–24.
27. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling* 2011; 27: 1087–93.
28. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 4653-61
29. Rollin G, Tan X, Tros F, et al. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells: a matter of growth or persistence. *Front Microbiol* 2017; 8: 1354.
30. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol (Praha)* 2011; 56: 191–200.
31. Dupieux C, Trouillet-Assant S, Camus C, et al. Intraosteoblastic activity of daptomycin in combination with oxacillin and ceftaroline against MSSA and MRSA. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 3353–6.

32. Maurin M, Benoliel AM, Bongrand P, Raoult D. Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. J Infect Dis 1992; 166: 1097–102.

DISCUSSION – PERSPECTIVES

L'amélioration du traitement des IOA à *S. aureus* est une problématique de recherche importante. En effet, ces infections évoluent fréquemment vers des formes chroniques et réfractaires au traitement malgré une prise en charge chirurgicale appropriée et une thérapie antimicrobienne prolongée (169). Les phénotypes bactériens, comme la persistance intracellulaire au sein des ostéoblastes ainsi que la formation de biofilm, qui limitent ou empêchent l'action des cellules immunitaires et de la plupart des antimicrobiens, conduisent au développement de réservoirs bactériens, favorisant les rechutes (4,5).

Comme décrit dans la synthèse bibliographique de cette thèse, la phagothérapie suscite beaucoup d'espoirs pour améliorer la prise en charge des patients atteints d'IOA chroniques. Si le recours à l'utilisation de bactériophages produits par la société Pherecydes Pharma a été autorisé par l'Agence Nationale de la Sécurité et du Médicament à titre compassionnel dans le traitement de patients atteints d'IOA à *S. aureus* récidivantes malgré plusieurs lignes de traitement, l'activité de ces bactériophages au sein des réservoirs que sont les biofilms et les cellules osseuses, est encore mal connue. Des études sont donc indispensables pour mieux caractériser leur activité *in vitro* et supporter la réalisation d'essais cliniques. C'est pourquoi dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité d'un assemblage de trois bactériophages sur *S. aureus* dans un modèle de biofilm mature et un modèle d'infection d'ostéoblastes humains. Pour cela, nous avons testé différentes concentrations de bactériophages, utilisés seuls ou en association avec deux antibiotiques couramment utilisés pour traiter les IOA, la rifampicine ou la vancomycine, présentant des profils d'activité très différents. La première est active aussi bien sur les formes sessiles que les formes du biofilm ou intracellulaires, la seconde n'ayant qu'une capacité faible de pénétration dans les deux types de réservoirs.

Nous avons observé que l'activité des bactériophages sur les staphylocoques au sein du biofilm était concentration dépendante et qu'ils étaient fortement actifs à partir de 10^7 PFU/mL. Cet effet était alors équivalent à celui de la rifampicine utilisée à concentration osseuse, antibiotique qui occupe une place de choix dans le traitement des IOA notamment grâce à son activité anti-biofilm (56). Un effet antibiofilm des bactériophages a donc été

obtenu *in vitro* pour des concentrations de bactériophages bien inférieures à celles des suspensions de bactériophages administrées localement par injection intra-articulaire lors des traitements compassionnels aux HCL (10^9 PFU/mL) (10). L'association des phages aux antibiotiques permettait dans notre modèle d'augmenter l'activité de ces derniers, notamment pour les plus faibles concentrations, pour lesquelles l'antibiotique seul n'était pas ou que très peu actif. Cet effet synergique est particulièrement intéressant dans le contexte des IOA. En effet, en raison d'une mauvaise diffusion des antibiotiques dans l'os, leur concentration dans certaines zones du tissu infecté peut être faible et l'association avec des bactériophages dans ces situations pourrait contribuer à maintenir une efficacité de l'antibiothérapie (54). Ces résultats sont en accord avec ceux de précédentes études ayant démontré l'activité antibiofilm de bactériophages sur plusieurs espèces bactériennes et l'intérêt de les associer à des antibiotiques. Trois études récentes ont notamment décrit *in vitro* que l'effet de l'association de bactériophages, anti-*P. aeruginosa* ou anti-*S. aureus* et de certains antibiotiques sur le biofilm était augmenté si les phages étaient utilisés avant les antibiotiques. Cependant, des études complémentaires utilisant des modèles *in vivo* méritent d'être réalisées pour confirmer l'intérêt de traitements séquentiels.

Si l'activité antibiofilm des bactériophages est bien décrite dans la littérature, il n'y a à ce jour pas de données sur leur effet sur les bactéries internalisées dans des ostéoblastes. Nous avons pu montrer dans ce travail par microscopie électronique que les bactériophages pouvaient pénétrer dans les ostéoblastes infectés. Ils étaient par ailleurs détectés en grande quantité dans les lysats de cellules infectées contrairement aux lysats des cellules non infectées après 24h de traitement, suggérant que leur internalisation se faisait par un mécanisme de type « cheval de Troie », dépendant de *S. aureus*. Cependant, nos données suggèrent que ces bactériophages ne sont pas actifs contre *S. aureus* une fois internalisé dans les ostéoblastes. Seules deux autres études ont évalué l'activité intracellulaire de bactériophages et leurs résultats sont contradictoires. Zhang *et al.* ont affirmé que le bactériophage vB_SauM_JS25 anti *S. aureus* pénétrait dans les cellules épithéliales mammaires bovines et était efficace contre les bactéries intracellulaires en montrant que l'inoculum bactérien intracellulaire dans des cellules infectées traitées par le bactériophage était inférieur à celui retrouvé dans des cellules non traitées (127). Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas comparé l'effet d'un traitement par bactériophages à celui d'un traitement par un agent antimicrobien actif

uniquement contre les bactéries extracellulaires comme la lysostaphine. Il est donc difficile d'affirmer sur la base de leurs données que la différence observée entre les deux conditions ne pouvait être expliquée que par l'action intracellulaire des bactériophages et non par le fait qu'en l'absence de traitement, les bactéries auraient pu entraîner la lyse des cellules infectées, se multiplier dans le milieu extracellulaire, infecter de nouvelles cellules, et entraîner la présence d'un inoculum intracellulaire plus important qu'en présence de bactériophages. Dans la deuxième étude, Kaur *et al.* ont montré que le traitement par le bactériophage MR-5 n'augmentait pas le pouvoir bactéricide des macrophages sur *S. aureus* alors que l'adsorption de ce bactériophage sur des bactéries avant leur application sur les macrophages infectés permettait une réduction de l'inoculum intracellulaire (170). Les auteurs supposaient que les bactériophages pouvaient être transportés à l'intérieur des macrophages grâce aux bactéries, mécanisme que nous suggérons également dans notre travail pour l'internalisation des bactériophages dans les ostéoblastes. L'activité intracellulaire des bactériophages est probablement influencée tout d'abord par l'absence de multiplication de *S. aureus* internalisé dans les ostéoblastes. L'état physiologique de ces bactéries n'est pas clairement établi dans la littérature et est probablement variable d'une cellule à l'autre (171). Si les bactériophages sont internalisés dans une cellule dans laquelle les bactéries ne se multiplient pas ou plus, ils ne peuvent entrer en cycle lytique et détruire ces bactéries. Par ailleurs, le pH acide intracellulaire pourrait également les rendre inactifs (172). Dans ce contexte, l'association des bactériophages à des agents alcalinisant (comme la chloroquine, qui est utilisé en association aux cyclines au cours du traitement d'infections par une bactérie intracellulaire, *Coxiella burnetii*) mériterait d'être évaluée, pour savoir si elle serait capable de restaurer l'activité intracellulaire des bactériophages.

Les données de la littérature (études précliniques, rapports de l'expérience dans les pays de l'Europe de l'Est ou des traitements compassionnels dans les pays occidentaux, ainsi que les rares essais cliniques) positionnent la phagothérapie comme une stratégie thérapeutique très prometteuse face à l'émergence de l'antibio-résistance et pour la prise en charge d'infections chroniques multirécidivantes. Son développement est malheureusement pour l'instant limité dans les pays occidentaux pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il n'existe pas de cadre réglementaire propre à la production et à l'utilisation des bactériophages. Ils relèvent actuellement par défaut de la réglementation applicable aux médicaments. L'autorisation

d'utilisation par l'ANSM dans le cadre d'Autorisations Temporaires d'Utilisation (ATU) ou d'essais cliniques nécessite donc une production selon les BPF impliquant des équipements, structures et procédures adaptés et lourds (173). Ce statut contraint théoriquement à la constitution de dossiers de validation et de réalisations d'essais cliniques pour chaque bactériophage et assemblage de bactériophages. Etant donnée la diversité des phages pouvant être produits, ceci semble difficilement réalisable. Ce cadre réglementaire implique également la production et le stockage des bactériophages sous forme de cocktails préassemblés. Ceci empêche la sélection des bactériophages et la personnalisation du cocktail selon le profil de sensibilité de la (des) souche(s) bactérienne(s) responsable(s) de l'infection et pourrait entraîner une diminution des titres de bactériophages au cours du temps, comme cela a été observé au cours de l'essai clinique Phagoburn (162,174). Enfin, le développement de la phagothérapie est actuellement assuré par de petites ou moyennes entreprises ou par des structures universitaires ne disposant pas des budgets pour assumer les coûts associés à ce standard de production et la phagothérapie ne semble pas encore intéresser les grands groupes pharmaceutiques. Une adaptation de la réglementation apparaît donc nécessaire pour permettre l'essor de la phagothérapie (175).

Pour faire face à ce problème, en Belgique, le ministère de la santé a notamment accepté de classer les suspensions de bactériophages en tant que préparation magistrale. Une préparation magistrale est un médicament préparé par ou sous la responsabilité d'un pharmacien pour un patient donné et selon une prescription médicale, en raison de l'absence de spécialité disponible ou adaptée. Si les ingrédients d'une telle préparation ne sont pas inscrits à la Pharmacopée (comme pour les bactériophages), ils doivent être accompagnés d'un certificat d'analyse fourni par un laboratoire autorisé attestant de la production conforme à une monographie qui a récemment été rédigée par l'agence belge du médicament et des produits de santé (176). Cependant, contrairement au statut des médicaments, qui répartit les responsabilités en matière de sécurité entre le prescripteur, le pharmacien, le titulaire de l'autorisation de mise sur le marché et les autorités réglementaires, une formule magistrale fait porter la majeure partie de la responsabilité sur le prescripteur et le pharmacien. Cette stratégie d'évolution du statut des bactériophages adoptée en Belgique est pionnière. Les adaptations du cadre légal seront peut-être différentes en fonction des pays,

mais il serait souhaitable qu'une position commune soit adoptée à l'échelle européenne afin de faciliter les échanges entre les pays.

Enfin, l'utilisation d'endolysines de bactériophages purifiées est également une alternative thérapeutique intéressante (« enzybiotiques ») (89). Même si elles sont principalement actives sur les bactéries à Gram positif, elles ont l'avantage d'avoir un spectre un peu plus large que les bactériophages (selon les lysines, à l'échelle du genre bactérien, alors que les bactériophages sont spécifiques d'une espèce et souvent pas actifs sur toutes les souches d'une même espèce). Le risque de résistance bactérienne aux endolysines est également faible car leurs cibles, le peptidoglycane, sont très conservées et essentielles à la réplication bactérienne (90). Leur développement est plus récent que celui de la phagothérapie (début des années 2000) et nous disposons donc de moins de données sur leur potentiel thérapeutique (essentiellement des études avec des modèles animaux) (177–179). La lysine CF-301 active contre les staphylocoques a cependant été évaluée dans des essais cliniques de phase I et fait actuellement l'objet d'essais de phase 2 pour traiter des patients atteints de bactériémie ou d'endocardite à SARM (92).

BIBLIOGRAPHIE

1. Laurent E, Gras G, Druon J, Rosset P, Baron S, Le-Louarn A, et al. Key features of bone and joint infections following the implementation of reference centers in France. *Médecine et Maladies Infectieuses*. juin 2018;48(4):256-62.
2. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Recommandations de pratique clinique - Infections ostéo-articulaires sur matériel (prothèse, implant, ostéosynthèse) [Internet]. 2009. Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/inf-osseuse-court.pdf
3. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. janv 2013;56(1):e1-25.
4. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014;9(8):987-1007.
5. Josse J, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. osteoblast: relationship and consequences in osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 26 nov 2015;5(85).
6. d'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences*. 1917;165:373-5.
7. Kutateladze M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virologica Sinica*. févr 2015;30(1):80-1.
8. Akanda ZZ, Taha M, Abdelbary H. Current review - The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *J Orthop Res*. avr 2018;36(4):1051-60.
9. Ferry T, Boucher F, Fevre C, Perpoint T, Chateau J, Petitjean C, et al. Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages. *J Antimicrob Chemother*. oct 2018;73(10):2901-3.
10. Ferry T, Leboucher G, Fevre C, Herry Y, Conrad A, Josse J, et al. Salvage 'DAIR' (debridement, antibiotics and implant retention) with local injection of a selected cocktail of bacteriophages: is it an option for an elderly patient with relapsing *S. aureus* prosthetic-joint infection? *Open Forum Infect Dis*. 24 oct 2018;5(11).
11. Haute Autorité de Santé. Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation - Recommandations pour la pratique clinique. [Internet]. 2014 [cité 7 janv 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-03/rbp_recommandations_protheses_infectees_vd.pdf

12. Rochford ETJ, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* déc 2012;18(12):1162-7.
13. Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL. Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect Immun.* avr 1999;67(4):1640-5.
14. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 14 oct 2004;351(16):1645-54.
15. Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ, Huddleston PM. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am.* 20 mai 2015;97(10):837-45.
16. Grammatico-Guillon L, Baron S, Gettner S, Lecuyer A-I, Gaborit C, Rosset P, et al. Bone and joint infections in hospitalized patients in France, 2008: clinical and economic outcomes. *J Hosp Infect.* sept 2012;82(1):40-8.
17. Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty.* oct 2008;23(7):984-91.
18. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* juin 2011;25(3):407-21.
19. Tarkowski A. Infectious arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* déc 2006;20(6):1029-44.
20. Shirtliff ME, Mader JT. Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev.* oct 2002;15(4):527-44.
21. Dubost JJ, Soubrier M, De Champs C, Ristori JM, Bussi  re JL, Sauvezie B. No changes in the distribution of organisms responsible for septic arthritis over a 20 year period. *Ann Rheum Dis.* mars 2002;61(3):267-9.
22. Triffault-Fillit C, Ferry T, Laurent F, Pradat P, Dupieux C, Conrad A, et al. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* mai 2018;
23. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* d  c 2005;5(12):751-62.
24. Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W. Periprosthetic joint infection following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect.* juill 2011;63(1):17-22.
25. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 21 mai 1999;284(5418):1318-22.

27. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* juill 2009;11(7):1034-43.
28. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop.* avr 2015;86(2):147-58.
29. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R. Intracellular *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance: implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *J Orthop Res.* janv 2006;24(1):87-93.
30. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* juin 2005;87(6):1343-7.
31. Sinha B, Fraunholz M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol.* févr 2010;300(2-3):170-5.
32. Olivier AC, Lemaire S, Van Bambeke F, Tulkens PM, Oldfield E. Role of *rsbU* and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J Infect Dis.* nov 2009;200(9):1367-70.
33. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem.* 26 janv 2007;282(4):2695-706.
34. Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of *in vitro*, animal and clinical data. *J Antimicrob Chemother.* juill 2013;68(7):1455-64.
35. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept - the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* mai 2006;37 Suppl 2:S26-33.
36. Pelletier LL, Richardson M, Feist M. Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med.* août 1979;94(2):324-34.
37. Palestro CJ, Love C, Miller TT. Imaging of musculoskeletal infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* déc 2006;20(6):1197-218.
38. Dutronc H, Bocquentin F, Dupon M. Apport de l'imagerie au diagnostic de l'infection ostéoarticulaire. *Med Mal Infect.* juin 2004;34(6):257-63.
39. Morel A, Le Duc-Pennec A, Dubrana F, Blanc-Beguvin F, Querellou S, Keromnes N, et al. Évaluation de la valeur prédictive positive de la scintigraphie aux leucocytes marqués dans le diagnostic d'infections ostéo-articulaires. *Médecine Nucléaire.* avr 2015;39(2):122-30.
40. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 1 sept 2010;92(11):2102-9.

41. Alijanipour P, Bakhshi H, Parvizi J. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the threshold for serological markers. *Clin Orthop Relat Res.* oct 2013;471(10):3186-95.
42. Honsawek S, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, Sakdinakiattikoon M, Ngarmukos S, Preativatanyou K, et al. Relationship of serum IL-6, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and knee skin temperature after total knee arthroplasty: a prospective study. *Int Orthop.* janv 2011;35(1):31-5.
43. Frangiamore SJ, Gajewski ND, Saleh A, Farias-Kovac M, Barsoum WK, Higuera CA. α -defensin accuracy to diagnose periprosthetic joint infection-best available test? *J Arthroplasty.* févr 2016;31(2):456-60.
44. Ettinger M, Calliess T, Kielstein JT, Sibai J, Brückner T, Lichtinghagen R, et al. Circulating biomarkers for discrimination between aseptic joint failure, low-grade infection, and high-grade septic failure. *Clin Infect Dis.* 1 août 2015;61(3):332-41.
45. Laurent F, Rottman M. Infections osseuses et articulaires. In: *Référentiel en microbiologie médicale.* 6ème édition. 2018. p. 313-20.
46. Font-Vizcarra L, García S, Martínez-Pastor JC, Sierra JM, Soriano A. Blood culture flasks for culturing synovial fluid in prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res.* août 2010;468(8):2238-43.
47. Zuluaga AF, Galvis W, Jaimes F, Vesga O. Lack of microbiological concordance between bone and non-bone specimens in chronic osteomyelitis: an observational study. *BMC Infect Dis.* 16 mai 2002;2:8.
48. Bemmer P, Plouzeau C, Tande D, Leger J, Giraudeau B, Valentin AS, et al. Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study. *J Clin Microbiol.* 1 oct 2014;52(10):3583-9.
49. Goldenberg DL, Brandt KD, Cohen AS, Cathcart ES. Treatment of septic arthritis: comparison of needle aspiration and surgery as initial modes of joint drainage. *Arthritis Rheum.* févr 1975;18(1):83-90.
50. Munro JT, Garbuz DS, Masri BA, Duncan CP. Articulating antibiotic impregnated spacers in two-stage revision of infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.* nov 2012;94-B(11_Supple_A):123-5.
51. Wolf CF, Gu NY, Doctor JN, Manner PA, Leopold SS. Comparison of one and two-stage revision of total hip arthroplasty complicated by infection: a Markov expected-utility decision analysis. *J Bone Joint Surg Am.* avr 2011;93(7):631-9.
52. Kunutsor SK, Whitehouse MR, Lenguerrand E, Blom AW, Beswick AD, INFORM Team. Re-infection outcomes following one- and two-stage surgical revision of infected knee prosthesis: a systematic review and meta-analysis. Baur H, éditeur. *PLoS One.* 11 mars 2016;11(3):e0151537.

53. Li H-K, Rombach I, Zambellas R, Walker AS, McNally MA, Atkins BL, et al. Oral *versus* intravenous antibiotics for bone and joint infection. *N Engl J Med*. 31 janv 2019;380(5):425-36.
54. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(2):89-124.
55. Valour F, Trouillet-Assant S, Riffard N, Tasse J, Flammier S, Rasigade J-P, et al. Antimicrobial activity against intraosteoblastic *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2015;59(4):2029-36.
56. Zimmerli W, Sendi P. The role of rifampin against staphylococcal biofilm infections *in vitro*, in animal models, and in orthopedic device-related infections. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2019;63(2).
57. Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 août 2009;53(8):3505-7.
58. Garrigos C, Murillo O, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C, et al. Efficacy of usual and high doses of daptomycin in combination with rifampin *versus* alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 déc 2010;54(12):5251-6.
59. Byren I, Rege S, Campanaro E, Yankelev S, Anastasiou D, Kuropatkin G, et al. Randomized controlled trial of the safety and efficacy of daptomycin *versus* standard-of-care therapy for management of patients with osteomyelitis associated with prosthetic devices undergoing two-stage revision arthroplasty. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2012;56(11):5626-32.
60. Roux S, Valour F, Karsenty J, Gagnieu M-C, Perpoint T, Lustig S, et al. Daptomycin > 6 mg/kg/day as salvage therapy in patients with complex bone and joint infection: cohort study in a regional reference center. *BMC Infect Dis*. déc 2016;16:83.
61. Morata L, Senneville E, Bernard L, Nguyen S, Buzelé R, Druon J, et al. A retrospective review of the clinical experience of linezolid with or without rifampicin in prosthetic joint infections treated with debridement and implant retention. *Infect Dis Ther*. déc 2014;3(2):235-43.
62. Rao N, Ziran BH, Hall RA, Santa ER. Successful treatment of chronic bone and joint infections with oral linezolid. *Clin Orthop Relat Res*. oct 2004;(427):67-71.
63. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezeque H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 15 août 2011;53(4):334-40.

64. Ministère du Travail de l'Emploi et de la Santé. INSTRUCTION N°DGOS/PF2/2010/466 [Internet]. 2010 [cité 28 janv 2019]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/instruction_466_271210.pdf
65. Ferry T, Seng P, Mainard D, Jenny J-Y, Laurent F, Senneville E, et al. The CRIOAc healthcare network in France: A nationwide Health Ministry program to improve the management of bone and joint infection. *Orthop Traumatol Surg Res*. nov 2018;105(1):185-90.
66. Bergh Ø, Børsheim KY, Bratbak G, Heldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. août 1989;340(6233):467-8.
67. Barr JJ. A bacteriophages journey through the human body. *Immunol Rev*. sept 2017;279(1):106-22.
68. Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. janv 2011;1(1):31-45.
69. Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Micro*. déc 2015;13(12):777-86.
70. Keen EC. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology: Cause to reflect. *BioEssays*. janv 2015;37(1):6-9.
71. Burnet FM. The classification of dysentery-Coli bacteriophages. III. A correlation of the serological classification with certain biochemical tests. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1933;37(2):179-84.
72. Ruska H. Versuch zu einer Ordnung der Virusarten. *Arch Ges Virusforsch*. 1943;2:480.
73. Bradley DE. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol Rev*. déc 1967;31(4):230-314.
74. Elbreki M, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Journal of Viruses*. 2014;2014.
75. Fokine A, Rossmann MG. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*. 1 janv 2014;4(1):e28281.
76. Novik G, Ladutska A, Rakhuba D. Bacteriophage taxonomy and classification. In: *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational program*. A. Méndez-Vilas; p. 251-9.
77. Duckworth DH. Who discovered bacteriophage? *Bacteriol Rev*. déc 1976;40(4):793-802.
78. Hankin E. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann Inst Pasteur*. 1896;10:511-23.

79. Twort FW. An investigation of the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. déc 1915;186(4814):1241-3.
80. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*. oct 2001;55(1):437-51.
81. Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage. *Compt Rend Soc Biol*. 1921;85:1120-1.
82. Eaton MD, Bayne-Jones S. Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *J Am*. 15 déc 1934;103(24):1847.
83. Site de l'Institut Eliava. [Internet]. [cité 10 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.eliava-institute.org/?rid=2>
84. WHO. WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. [Internet]. 2015 [cité 21 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
85. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. janv 2019;19(1):56-66.
86. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally : final report and recommendations. [Internet]. [cité 12 févr 2019]. Disponible sur: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
87. Servick K. U.S. center will fight infections with viruses. *Science*. 22 juin 2018;360(6395):1280-1.
88. Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:799-825.
89. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*. oct 2012;7(10):1147-71.
90. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol*. 1 août 2010;300(6):357-62.
91. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol*. août 2005;8(4):480-7.
92. Safety, efficacy and pharmacokinetics of CF-301 vs. placebo in addition to antibacterial therapy for treatment of *S. aureus* bacteremia [Internet]. [cité 29 août 2018]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163446>
93. Marza JAS, Soothill JS, Boydell P, Collyns TA. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns*. août 2006;32(5):644-6.

94. Aslam S, Yung G, Dan J, Reed S, LeFebvre M, Logan C, et al. Bacteriophage treatment in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant*. avr 2018;37(4):S155-6.
95. Galtier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies M-A, et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition: Reducing intestinal carriage with bacteriophages. *Environ Microbiol*. juill 2016;18(7):2237-45.
96. Cieplak T, Soffer N, Sulakvelidze A, Nielsen DS. A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota. *Gut Microbes*. 24 août 2018;1-9.
97. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. mars 2011;1(2):111-4.
98. Torres-Barceló C, Hochberg ME. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol*. avr 2016;24(4):249-56.
99. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. Fox D, éditeur. *PLoS ONE*. 29 août 2007;2(8):e799.
100. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Appl Environ Microbiol*. 1 déc 2012;78(23):8227-33.
101. Kamal F, Dennis JJ. *Burkholderia cepacia* complex phage-antibiotic synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. Elliot MA, éditeur. *Appl Environ Microbiol*. 1 févr 2015;81(3):1132-8.
102. Knezevic P, Curcin S, Aleksic V, Petrusic M, Vlaski L. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*. janv 2013;164(1):55-60.
103. Kim M, Jo Y, Hwang YJ, Hong HW, Hong SS, Park K, et al. Phage-antibiotic synergy via delayed lysis. Dudley EG, éditeur. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 14 sept 2018 [cité 26 févr 2019];84(22). Disponible sur: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02085-18>
104. 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*. juill 2012;65(2):395-8.
105. Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. Schuch R, éditeur. *PLoS ONE*. 11 mars 2015;10(3):e0118557.

106. Henry M, Biswas B, Vincent L, Mokashi V, Schuch R, Bishop-Lilly KA, et al. Development of a high throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog™ system. *Bacteriophage*. juill 2012;2(3):159-67.
107. Xie Y, Wahab L, Gill J. Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence. *Viruses*. 12 avr 2018;10(4):189.
108. Henry M, Lavigne R, Debarbieux L. Predicting *in vivo* efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother*. déc 2013;57(12):5961-8.
109. Hadas H, Einav M, Fishov I, Zaritsky A. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology*. janv 1997;143(Pt 1):179-85.
110. Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J Ind Microbiol*. juin 1996;16(6):331-41.
111. Pearl S, Gabay C, Kishony R, Oppenheim A, Balaban NQ. Nongenetic individuality in the host-phage interaction. *PLoS Biol*. 20 mai 2008;6(5):e120.
112. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):85-99.
113. Yan J, Mao J, Mao J, Xie J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*. juin 2014;28(3):265-74.
114. Harper DR, Parracho HMRT, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, et al. Bacteriophages and Bbiofilms. *Antibiotics*. 25 juin 2014;3(3):270-84.
115. Tkhilaishvili T, Lombardi L, Klatt A-B, Trampuz A, Di Luca M. Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. déc 2018;52(6):842-53.
116. Yazdi M, Bouzari M, Ghaemi EA. Isolation and characterization of a lytic bacteriophage (vB_PmiS-TH) and its application in combination with ampicillin against planktonic and biofilm forms of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2018;28(1):37-46.
117. Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Front Microbiol*. 2018;9:127.
118. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0168615.

119. Mapes AC, Trautner BW, Liao KS, Ramig RF. Development of expanded host range phage active on biofilms of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriophage*. 5 janv 2016;6(1).
120. Coulter L, McLean R, Rohde R, Aron G. Effect of bacteriophage infection in combination with tobramycin on the emergence of resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Viruses*. 3 oct 2014;6(10):3778-86.
121. Rahman M, Kim S, Kim SM, Seol SY, Kim J. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*. 16 nov 2011;27(10):1087-93.
122. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. *J Antimicrob Chemother*. 1 déc 2009;64(6):1212-8.
123. Verma V, Harjai K, Chhibber S. Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*. 17 juill 2010;26(6):729-37.
124. Khalifa L, Gelman D, Shlezinger M, Dessal AL, Copenhagen-Glazer S, Beyth N, et al. Defeating antibiotic- and phage-resistant *Enterococcus faecalis* using a phage cocktail *in vitro* and in a clot Model. *Front Microbiol*. 2018;9:326.
125. Huh H, Wong S, St. Jean J, Slavcev R. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev*. janv 2019;
126. Lehti TA, Pajunen MI, Skog MS, Finne J. Internalization of a polysialic acid-binding *Escherichia coli* bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells. *Nature Communications* [Internet]. déc 2017 [cité 26 févr 2019];8(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-02057-3>
127. Zhang L, Sun L, Wei R, Gao Q, He T, Xu C, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* control by virulent bacteriophages within MAC-T bovine mammary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2017;61(2).
128. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Appl Environ Microbiol*. mai 2014;98(10):4653-61.
129. Ochieng' Oduor JM, Onkoba N, Maloba F, Nyachio A. Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *Afr J Lab Med*. 30 sept 2016;5(1).
130. Pabary R, Singh C, Morales S, Bush A, Alshafi K, Bilton D, et al. Antipseudomonal bacteriophage reduces infective burden and inflammatory response in murine lung. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2016;60(2):744-51.

131. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J-D. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. Crit Care Med. juin 2015;43(6):e190-8.
132. Waters EM, Neill DR, Kaman B, Sahota JS, Clokie MRJ, Winstanley C, et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Thorax. juill 2017;72(7):666-7.
133. Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, Young RF, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. J Infect Dis. 15 janv 2010;201(2):264-71.
134. Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, Guinane CM, Martin JG, Shanahan F, et al. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. MBio. 2012;3(2):e00029-00012.
135. Chhibber S, Kaur S, Kumari S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. J Med Microbiol. déc 2008;57(Pt 12):1508-13.
136. Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, Morimoto N, Asagiri T, Ujihara T, et al. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. Microbes and Infection. juin 2014;16(6):512-7.
137. Vinodkumar C, Kalsurmath S, Neelagund Y. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. Indian J Pathol Microbiol. 2008;51(3):360.
138. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. Antimicrob Agents Chemother. août 2007;51(8):2765-73.
139. Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, Ercolini D, Parlato M, Chiara M, et al. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. J Infect Dis. janv 2010;201(1):52-61.
140. Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y, et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Antimicrob Agents Chemother. 1 févr 2007;51(2):446-52.
141. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Med. févr 2006;17(2):309-17.
142. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. Int J Mol Med. févr 2006;17(2):347-55.

143. Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, Gabard J, Moreillon P, Entenza JM, et al. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *J Infect Dis.* 22 déc 2016;jiw632.
144. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, 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.* juill 2012;56(7):3568-75.
145. Chhibber S, Shukla A, Kaur S. Transfersomal phage cocktail is an effective treatment against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-mediated skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2017;61(10).
146. Regeimbal JM, Jacobs AC, Corey BW, Henry MS, Thompson MG, Pavlicek RL, et al. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2016;60(10):5806-16.
147. Shivaswamy VC, Kalasuramath SB, Sadanand CK, Basavaraju AK, Ginnavaram V, Bille S, et al. Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats. *Microb Drug Resist.* avr 2015;21(2):171-7.
148. Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am.* janv 2013;95(2):117-25.
149. Kishor C, Mishra R, Saraf S, Kumar M, Srivastav A, Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. *Ind J Med Res.* 2016;143(1):87.
150. Kaur S, Harjai K, Chhibber S, Becker K. *In vivo* assessment of phage and linezolid based implant coatings for treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) mediated orthopaedic device related infections. *PLoS ONE.* 22 juin 2016;11(6):e0157626.
151. Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. Becker K, éditeur. *PLoS ONE.* 13 févr 2013;8(2):e56022.
152. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect.* août 2008;38(8):426-30.
153. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect.* janv 1998;36(1):5-15.
154. Aslam S, Pretorius V, Lehman SM, Morales S, Schooley RT. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J Heart Lung Transplant.* janv 2019;

155. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. *Open Forum Infect Dis.* 1 avr 2018;5(4).
156. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Ev Med Pub Health.* 1 janv 2018;2018(1):60-6.
157. Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit Care.* déc 2017;21:129.
158. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, 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.* oct 2017;61(10).
159. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care.* juin 2009;18(6):237-8, 240-3.
160. Wright A, Hawkins CH, Änggård 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.* août 2009;34(4):349-57.
161. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine.* févr 2016;4:124-37.
162. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, 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.* 3 oct 2018;19(1):35-45.
163. Expert round table on acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy, Sybesma W, Rohde C, Bardy P, Pirnay J-P, Cooper I, et al. Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy-Part II. *Antibiotics.* 23 avr 2018;7(2):35.
164. Abedon ST. Information phage therapy research should report. *Pharmaceuticals.* 30 avr 2017;10(4):43.
165. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Micro.* mai 2010;8(5):317-27.
166. Örmälä A-M, Jalasvuori M. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage.* janv 2013;3(1):e24219.

167. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 30 juin 2018;10(7):351.
168. Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res*. 2012;83:73-121.
169. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhawe A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet*. 23 janv 2016;387(10016):386-94.
170. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *App Microb Biotech*. mai 2014;98(10):4653-61.
171. Rollin G, Tan X, Tros F, Dupuis M, Nassif X, Charbit A, et al. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells: a matter of growth or persistence. *Front Microbiol*. 19 juill 2017;8:1354.
172. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*. mai 2011;56(3):191-200.
173. Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé. CSST Phagothérapie - Compte-rendu du 24/03/2016 [Internet]. [cité 12 févr 2019]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/dbbaf436555bcfcba236abf24e4c242b.pdf
174. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceyssens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The magistral phage. *Viruses*. 6 févr 2018;10(2):64.
175. Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Front Cell Infect Microbiol*. 23 oct 2018;8.
176. Phage Active Pharmaceutical Ingredients. In: General Monograph - Version 10 [Internet]. [cité 15 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/2/64/s1>
177. Kim N-H, Park WB, Cho JE, Choi YJ, Choi SJ, Jun SY, et al. Effects of phage endolysin SAL200 combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 23 juill 2018;
178. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. nov 2003;71(11):6199-204.
179. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, Khan BK, et al. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis*. 1 mai 2014;209(9):1469-78.

CONCLUSIONS

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08**

Thèse soutenue par Madame Camille KOLENDA

Les infections ostéoarticulaires (IOA) à *Staphylococcus aureus* évoluent fréquemment vers des formes chroniques en raison de mécanismes physiopathologiques spécifiques développés par cette bactérie (formation de biofilm, internalisation et persistance dans les ostéoblastes) favorisant les échecs thérapeutiques qui surviennent malgré un traitement chirurgical et antibiotique adapté. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avère donc indispensable pour améliorer la prise en charge de ces infections qui constituent un problème majeur de santé publique.

Dans ce contexte, le recours à la phagothérapie, qui utilise des bactériophages qui sont des virus spécifiques des bactéries, constitue une des options thérapeutiques suscitant le plus d'intérêt. Ainsi, plusieurs patients pris en charge par le Centre de Référence des Infections Ostéo-Articulaires Complexes des Hospices Civils de Lyon ont récemment bénéficié à titre compassionnel de traitements par des bactériophages produits par la société française Pherecydes Pharma. Dans le cadre de notre travail, nous avons évalué l'activité *in vitro* d'un assemblage de trois bactériophages, utilisé seul ou en association avec un antibiotique, sur la souche *S. aureus* HG001 dans un modèle de biofilm et un modèle d'infection d'ostéoblastes humains. Les deux antibiotiques testés dans cette étude, la rifampicine et la vancomycine, sont classiquement utilisés dans le traitement des IOA, la première ayant une activité reconnue à la fois sur le biofilm et sur les bactéries intracellulaires alors que le second est considéré comme peu actif sur ces deux formes de bactéries sanctuarisées.

Nos résultats ont montré que l'activité bactéricide des bactériophages sur *S. aureus* au sein du biofilm était concentration dépendante, avec une réduction de l'inoculum bactérien (par rapport à la condition contrôle non traitée) de 1.5 à 3.7 log après 24h d'exposition à des suspensions de bactériophages de 10^6 à 10^8 PFU/mL (Plaques Forming Unit, unité de dénombrement des phages). L'activité antibiofilm maximale des bactériophages était comparable à celle de la rifampicine seule à concentration osseuse usuelle. Nous avons également observé des effets synergiques principalement en cas d'association des bactériophages à la vancomycine aux concentrations les plus faibles, qui n'avaient pas ou peu d'effet bactéricide sur les bactéries du biofilm en monothérapie.

Dans le modèle d'infection d'ostéoblastes humains, nous avons pu montrer en microscopie électronique et par dénombrement des PFU dans les lysats cellulaires que la pénétration des phages dans les ostéoblastes n'était possible que quand les cellules étaient infectées par *S. aureus*, suggérant un mécanisme de type cheval de Troie dépendant de *S. aureus*. Par ailleurs, l'inoculum bactérien à l'intérieur des cellules exposées pendant 24h aux bactériophages était significativement supérieur à celui des mêmes cellules traitées par lysostaphine (molécule permettant la destruction très rapide des bactéries libérées dans le milieu extracellulaire après lyse des cellules infectées mais sans activité intracellulaire). Ces résultats suggèrent que les bactériophages sont probablement à la fois i) Inactifs dans le compartiment intracellulaire et ii) incapables de tuer suffisamment rapidement les bactéries libérées par lyse cellulaire dans le milieu extracellulaire pour les empêcher de réinfecter d'autres ostéoblastes, comme le fait la lysostaphine. L'activité des bactériophages dans ce modèle était équivalente à celle de la vancomycine. L'inoculum intracellulaire après 24h de traitement par bactériophages + vancomycine était équivalent à celui retrouvé dans les cellules traitées par lysostaphine suggérant que cette association permettait une destruction plus efficace des bactéries libérées dans le milieu extracellulaire. Enfin, l'association rifampicine + bactériophages ne permettait pas d'augmenter l'activité de la rifampicine dans ce modèle, l'antibiotique seul étant déjà très actif sur les bactéries intracellulaires.

Au final, nos résultats ont permis de démontrer l'activité de l'assemblage des trois bactériophages de Pherecydes Pharma sur le biofilm formé par *S. aureus*, mécanisme physiopathologique majeur impliqué dans les IOA chroniques, et l'intérêt de les associer à des antibiotiques comme la vancomycine pour augmenter leur efficacité. L'absence

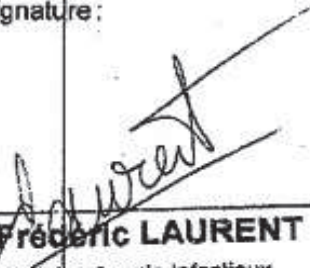
d'activité des bactériophages sur les bactéries intracellulaires dans notre modèle pourrait être liée au faible pH intracellulaire. L'utilisation concomitante d'agents alcalinisant (comme la chloroquine) mériterait d'être évaluée pour savoir si elle permettrait d'obtenir une activité intracellulaire des bactériophages. Des études complémentaires utilisant des modèles animaux d'IOA ainsi que la réalisation d'essais cliniques bien conduits sont nécessaires pour poursuivre l'évaluation de la phagothérapie et son positionnement dans le traitement des IOA.

Le Président de la thèse,

Nom :

Pr. F. LAURENT

Signature :



Pr Frédéric LAURENT

Institut des Agents Infectieux
Hôpital de la Croix Rousse - Hospices Civils de Lyon
103, Grande rue de la Croix Rousse
69004 Lyon - 04 72 07 18 37

Département de Microbiologie
ISPBL - Faculté de Pharmacie de Lyon
8, avenue Rockefeller - Pavillon Nétien
69008 Lyon - 04 78 77 70 00
frederic.laurent@univ-lyon1.fr - 08 74 25 65 09

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 18/02/2019

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard
Lyon 1,



Professeur C. VINCIGUERRA



KOLENDA Camille

Phagothérapie et infections ostéo-articulaires : évaluation de l'activité antibiofilm et antibactérienne intracellulaire d'un assemblage et trois bactériophages anti-*Staphylococcus aureus*

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2019, 112 p.

RESUME

Staphylococcus aureus est le premier agent causal des infections ostéo-articulaires (IOA). Il entraîne fréquemment des formes chroniques difficiles à traiter en raison de sa capacité à former des biofilms, à être internalisé et à persister dans les ostéoblastes. La phagothérapie constitue une des alternatives thérapeutiques suscitant actuellement le plus d'intérêt pour améliorer la prise en charge de ces infections. Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité d'un assemblage de 3 bactériophages, récemment utilisés aux Hospices Civils de Lyon pour le traitement compassionnel d'IOA, contre *S. aureus* dans un modèle de formation de biofilm et un modèle d'infection d'ostéoblastes humains.

Les activités bactéricides des bactériophages (Pherecydes Pharma) envers *S. aureus* HG001, utilisés seuls ou en association avec la vancomycine ou la rifampicine, ont été comparées en quantifiant le nombre de bactéries viables dans les biofilms matures et ostéoblastes infectés après 24h de traitement.

L'activité des bactériophages envers *S. aureus* au sein du biofilm était concentration dépendante et comparable à celle de la rifampicine. L'association des bactériophages aux antibiotiques permettait d'augmenter leur activité pour les concentrations les plus faibles qui ne permettaient pas d'obtenir un effet bactéricide significatif en monothérapie. Dans le modèle d'infection d'ostéoblastes humains, nous avons pu montrer par microscopie électronique et par dénombrement des phages dans les lysats cellulaires, que les bactériophages pouvaient pénétrer en grande quantité dans les cellules si elles étaient infectées par *S. aureus*. L'inoculum intracellulaire obtenu après traitement d'ostéoblastes infectés pendant 24h avec la vancomycine ou les bactériophages était significativement plus élevé qu'après 24h de traitement par lysostaphine (molécule permettant la destruction rapide des bactéries libérées dans le milieu extracellulaire et empêchant l'infection d'autres cellules). Ces données suggèrent que les bactériophages étaient i) inactifs dans le compartiment intracellulaire et ii) incapables de tuer suffisamment rapidement toutes les bactéries libérées par lyse cellulaire dans le milieu extracellulaire pour les empêcher de réinfecter d'autres ostéoblastes. Cependant, l'association des bactériophages avec la vancomycine permettait d'obtenir un inoculum intracellulaire significativement inférieur à celui retrouvé dans des cellules traitées par vancomycine ou phages seuls, suggérant que l'association permettait un meilleur contrôle des bactéries libérées dans le milieu extracellulaire et donc d'éviter la réinfection des ostéoblastes.

Notre étude a permis de montrer que les bactériophages testés étaient très actifs contre le biofilm formé par *S. aureus* mais n'avait pas d'activité contre les bactéries internalisées dans les ostéoblastes. Ils pourraient être une thérapeutique adjuvante intéressante pour le traitement des IOA, notamment pour augmenter l'activité de la vancomycine.

MOTS CLES

Infections ostéo-articulaires, Phagothérapie, Bactériophages, Biofilm, Ostéoblastes, Intracellulaire

JURY

Pr Frédéric LAURENT – Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Dr Jérôme JOSSE – Maître de Conférence des Universités

Pr Tristan FERRY – Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Dr Claude-Alexandre GUSTAVE – Assistant Hospitalo-Universitaire

Mr Mathieu MEDINA – Chef de Projet chez Pherecydes Pharma

DATE DE SOUTENANCE Mardi 12 Mars 2019

ADRESSE DE L'AUTEUR 19 rue Maryse Bastié 69008 LYON