

Université Paris Cité

Ecole doctorale BioSPC 562

*Laboratoire Inserm (UMR1137; IAME, équipe EVRest) / Institut Pasteur (Laboratoire
Bactériophage, Bactérie, Hôte)*

ÉTUDE PHARMACOMETRIQUE EXPERIMENTALE EN PHAGOTHÉRAPIE :

Dernière étape avant le redéploiement ?

Par Raphaëlle DELATTRE

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Jean-Damien RICARD et Laurent DEBARBIEUX

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 14/02/2022

Devant un jury composé de :

Président du jury : LEGOFF Jérôme, PU-PH, Hôpital Saint-Louis, Paris

Rapporteurs : PIRNAY Jean-Paul, PhD HDR, Queen Astrid Hospital, Bruxelles

ANDREJAK Claire, PU-PH, CHU Amiens

Examineur : FROISSART Rémy, CR-HDR, CNRS, Montpellier

Directeur de thèse : RICARD Jean-Damien, PU-PH, Hôpital Louis Mourier, Colombes

Co-directeur de thèse : DEBARBIEUX Laurent, DR-HDR, Laboratoire BBH-Institut Pasteur

Membre invité : TROUVIN Jean-Hugues, PU-PH émérite

ÉTUDE PHARMACOMETRIQUE EXPERIMENTALE EN PHAGOTHÉRAPIE :

Dernière étape avant le redéploiement ?

La phagothérapie consiste en l'utilisation de virus, les bactériophages, dans le but de traiter une infection bactérienne. Mise en pratique dans la première moitié du XXème siècle, mais détrônée par les antibiotiques, la phagothérapie connaît actuellement un regain d'intérêt en raison de l'antibiorésistance croissante des bactéries. Plusieurs freins restent néanmoins à lever avant de pouvoir réhabiliter la phagothérapie dans l'arsenal thérapeutique des cliniciens.

L'un des obstacles majeurs au redéploiement de la phagothérapie est l'absence de données pharmacométriques robustes. En effet, les données de pharmacocinétique disponibles dans la littérature ne contiennent que des éléments épars. Une méta-analyse semi-quantitative de ces données est rapportée dans un premier article. Dans un deuxième temps, j'ai pris comme modèle d'étude le couple composé de la souche *Escherichia coli* 536 et de son bactériophage virulent 536_P1. A l'aide d'expériences menées *in vitro* j'ai déterminé les caractéristiques cinétiques de l'infection par ce bactériophage. Puis en utilisant un modèle de phagothérapie d'une pneumonie murine j'ai étudié deux voies d'administration du bactériophage à différentes doses. A l'aide de ces données, nous avons développé un modèle mathématique permettant de quantifier et prédire l'impact des bactériophages sur la croissance bactérienne. Ces résultats font l'objet du second article présenté dans cette thèse.

Par ailleurs, j'ai aussi abordé la question des réglementations applicables à la production de bactériophages mais aussi plus généralement à la phagothérapie, qui ne font, pour l'instant, l'objet d'aucune disposition spécifique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit apportent ainsi des réponses expérimentales dans le domaine de la pharmacométrie mais aussi juridiques et posent ainsi des jalons supplémentaires en vue d'un recours plus courant à la phagothérapie. Les conclusions de cette thèse sont en faveur d'une avancée collective impliquant chercheurs, cliniciens, industriels et juristes pour permettre un redéploiement raisonné et raisonnable de cette thérapeutique à la mesure des espérances qu'elle suscite.

Mots clefs : Antibiorésistance – Bactériophage – Phagothérapie – Pneumonie – PK/PD

EXPERIMENTAL PHARMACOMETRICS STUDY IN PHAGE THERAPY :

Last step before redeployment ?

Phage therapy is the use of bacteria killing virus called bacteriophages, to treat infection. Initially developed in the first half of the 20th century, phage therapy has been rapidly supplanted by the use of antibiotics. Nowadays, interest in phage therapy is gaining weight as a way to counter the spread of antibiotic-resistant pathogens. However, several hurdles remain before phage therapy could be fully reintegrated in the therapeutic arsenal.

One of the major hurdles preventing the redeployment of phage therapy is the lack of robust pharmacometric data. Indeed, the pharmacokinetic data available in the literature contain only scattered elements. A semi-quantitative meta-analysis of these data is reported in a first article. Then, I used the *Escherichia coli* 536 strain and its virulent bacteriophage 536_P1 as a study model. Using *in vitro* experiments I determined the kinetic characteristics of the infection by this bacteriophage. Then, using a phage therapy model of murine pneumonia, I studied two routes of administration of the bacteriophage at different doses. Using these data, we developed a mathematical model to quantify and predict the impact of bacteriophage on bacterial growth. These results are the subject of a paper presented in this thesis. In addition, I also addressed the issue of regulations applicable to the production of bacteriophages but also more generally to phage therapy, which are not, for the moment, subject to any specific rule.

The work presented in this manuscript brings experimental answers in the field of pharmacometry but also in the legal field and thus sets additional milestones for a more regular use of phage therapy. The conclusions of this thesis are in favor of a collective effort involving researchers, clinicians, industrialists, and lawyers to allow a reasoned and reasonable redeployment of this therapy in line with the hopes it raises.

Keywords : Antibiotic resistance – Bacteriophage- phage therapy –Pneumonia – PK/PD

*À Rokhaya Kane, qui avait contaminé le labo avec sa
bonne humeur et son enthousiasme.*

*Aux Félix, qui, décidément, ont une façon bien à eux
de tracer leur route.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse Jean-Damien RICARD et Laurent DEBARBIEUX, pour votre accompagnement pendant ces 6 ans, tout ce que vous m'avez appris, votre aide, votre bienveillance, votre réactivité et votre adaptation à un emploi du temps parfois compliqué.

Je remercie les membres du jury de bien vouloir examiner ce travail et de participer à la soutenance.

Je remercie toute l'équipe IAME, en particulier Erick DENAMUR pour son accueil, son regard et son aide. Merci aussi aux Jérémie(y) GUEDJ & SEURAT sans qui il n'y aurait pas eu l'article de modélisation. Merci à François CHAU et au personnel de l'animalerie pour les conseils.

Je remercie l'équipe « Bactériophage, Bactérie, Hôte » de l'Institut Pasteur, les copains de galère du labo, pour la bonne ambiance, les bons repas, et les quelques bières. Je remercie le personnel de l'animalerie de l'Institut Pasteur. Je remercie l'Institut Pasteur, qui en collaboration avec l'APHP, a financé deux années de ma thèse.

Je remercie l'ANSM d'avoir financé une partie ce travail et de s'impliquer autant dans la phagothérapie.

Un grand merci à Nicolas DUFOUR. Tu m'as non seulement mis le pied à l'étrier de la phagothérapie, ouvert sur ce monde incroyable, tout appris des manip' et du reste, mais aussi encadrée et aidée pendant de longs mois.

Merci à l'équipe de la Pharmacie de Beaujon : Anthia MONRIBOT, Julie BATAILLE, et Nathalie PONS-KERJEAN, pour votre implication, tout le travail fourni et l'acharnement pour faire avancer la phagothérapie.

Merci à Baptiste GABORIEAU de prendre la suite, de faire avancer les choses, et de perpétuer la filière IAME / BBH.

Merci à Estelle RUFFIER pour le travail conjoint sur la pharmacocinétique, et pour ta persévérance.

Merci à ma mère, Cécile DELATTRE, pour tout le travail juridique présenté dans cette thèse, mais aussi pour les multiples relectures.

Merci à mes frères, aux amis pour la vie, aux nouveaux potes, à l'ancienne team de Beaujon, à la nouvelle de Digne, d'être là, toujours, parfois malgré la distance.

Merci à mon compagnon, du quotidien, de route, d'aventures et de rêves.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
PRÉAMBULE :.....	9
I. INTRODUCTION À LA PHAGOTHÉRAPIE	11
A. La phagothérapie et sa place dans la lutte contre les bactéries.....	11
1. La découverte de la phagothérapie	11
2. Le succès des antibiotiques et leur revers	12
3. Les alternatives aux antibiotiques.....	15
B. La phagothérapie : une alternative prometteuse aux antibiotiques.....	17
1. Qu'est-ce qu'un bactériophage ?.....	17
2. Comment discriminer un bactériophage virulent d'un tempéré ?.....	19
3. La caractérisation de l'effet antibactérien des bactériophages	20
4. L'efficacité dans les modèles animaux.....	21
5. Et chez l'Homme ?.....	22
C. Les bactériophages : un médicament pas comme les autres	25
1. Un spectre d'action bien plus étroit que celui des antibiotiques	25
2. À la recherche du cocktail anti- <i>E. coli</i> :	29
3. La résistance des bactéries aux bactériophages : un problème insurmontable ?... 32	
4. Le rôle du système immunitaire.....	35
5. Un traitement sans toxicité retrouvée.....	35
D. Un accès limité aux bactériophages.....	38
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE :	42
II. RÉSULTATS.....	43

A.	Trouver le cadre réglementaire :	43
1	La qualification juridique des bactériophages	44
2.	Dans quel cadre juridique administrer des bactériophages à un patient ?.....	46
B.	Trouver la juste dose	58
1.	Pharmacocinétique en phagothérapie : une revue analytique de la littérature	58
2.	Étude <i>in vivo</i> de phagothérapie expérimentale chez l'animal couplée à un modèle PK/PD	100
III.	DISCUSSION : Aller plus loin que la résistance	140
1.	La réalité de la résistance <i>in vivo</i>	140
2.	Quel impact de la résistance ?	141
3.	La résistance <i>in vivo</i> : une stratégie de contrôle microbien ?.....	143
	CONCLUSION	145
	BIBLIOGRAPHIE.....	148
	ANNEXES.....	160

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide dextribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARN : Acide ribonucléique

ATU : Autorisations temporaires d'utilisation

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CFU : Colonies formant des unités

CHMP : Comité des médicaments à usage humain

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSP : Code de santé publique

EDQM : Direction européenne de la qualité du médicament et soins de santé

EMA : Agence Européenne des médicaments

IL : Interleukine

IM : Intra-musculaire

IP : Intra-péritonéal

IV : Intra-veineux

LOQ : Limite de quantification

LPS : Lipopolysaccharide

MPS : Macrophage-phagocyte system

PD : Pharmacodynamique

PFU : Plaques formant des unités

PHACTS : Phage Classification Tool Set

PK : Pharmacocinétique

PO : *per os*

PTI : Produits de thérapeutiques innovantes

RTU : Recommandations temporaires d'utilisation

SC : Sous-cutané

Vd : Volume de distribution

WT : Wild type

PRÉAMBULE :

Alors que je terminais l'internat d'anesthésie-réanimation, j'ai eu l'occasion lors d'un congrès d'assister à une présentation donnée par Nicolas Dufour sur la phagothérapie. Confrontée quotidiennement aux infections à bactéries multi-résistantes, j'ai tout de suite entrevu dans la phagothérapie une possible alternative aux antibiotiques, trop souvent mis en échec en réanimation. C'est pourquoi, encadrée par Nicolas Dufour, Jean-Damien Ricard et Laurent Debarbieux, j'ai travaillé sur ce sujet en Master 2 puis en Doctorat.

J'ai rapidement réalisé d'une part le fossé existant entre le potentiel de la phagothérapie et son application limitée à quelques recours « compassionnels » et d'autre part la diversité des obstacles à franchir en vue de son déploiement. C'est avec la volonté de combler ce fossé que j'ai réalisé ce doctorat et rédigé ce manuscrit. Je me suis intéressée principalement à deux thèmes qui m'ont paru manifestes, d'abord la question de la réglementation applicable à la phagothérapie, et ensuite la pharmacométrie pour laquelle il manquait cruellement de données scientifiques. Ces deux thèmes sont traités dans la partie « Résultats ».

J'ai abordé le thème réglementaire avec l'aide d'une juriste, Cécile Delattre. Il est ainsi traité dans le premier point du chapitre « Résultats » de la qualification juridique du bactériophage et des réglementations applicables à leur production par des industriels d'une part, et au recours à la phagothérapie compassionnelle en hôpital d'autre part. J'y ai aussi cité le guide destiné aux cliniciens que j'ai co-écrit en 2020 avec une équipe de médecins et pharmaciens, guide qui est en attente de publication par les autorités de santé, et qui ai placé en Annexe III.

S'agissant de la pharmacométrie des bactériophages, les résultats que j'ai obtenus sont rapportés dans deux articles écrits pendant mon doctorat et repris dans cette thèse. Le premier est une synthèse analytique des données disponibles dans la littérature en matière de pharmacocinétique. Le second article concerne le développement d'un modèle mathématique basé sur des données expérimentales obtenues *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal de pneumonie. Les références des articles et du guide sont apposées à la suite des textes correspondant, tandis que les références du manuscrit de thèse sont rassemblées à la fin de celui-ci.

J'ai aussi été amenée à participer à d'autres travaux dont je donne également les résultats dans ce manuscrit. Pour en rendre la lecture plus aisée et éviter des redondances, j'ai choisi d'évoquer ces travaux et résultats lorsque j'abordais le sujet en question, dans les parties « Introduction » et « Discussion ». Ainsi, figurent notamment dans l'introduction les résultats obtenus à partir d'expériences menées sur le spectre d'hôte des bactériophages, et dans la discussion ceux obtenus par Baptiste Gaborieau que j'ai encadré au cours de son Master 2 sur les phénomènes de résistance bactérienne aux bactériophages.

Ce sujet de la résistance bactérienne et plus spécifiquement son impact en thérapeutique reste encore largement à explorer, et c'est la raison pour laquelle j'en ai fait le cœur de ma discussion dans laquelle j'ai dressé la liste des défis qui me semblent devoir encore être relevés, et ai proposé quelques jalons pour y parvenir.

Au-delà d'être le support à l'obtention d'un doctorat, je formule l'espoir que ce manuscrit aidera au redéploiement de cette thérapeutique trop vite oubliée !

I. INTRODUCTION À LA PHAGOTHÉRAPIE

A. La phagothérapie et sa place dans la lutte contre les bactéries

1. La découverte de la phagothérapie

C'est en septembre 1915 que Félix d'Hérelle, enquêtant sur une épidémie de dysenterie bacillaire à l'hôpital de Maisons-Laffitte, découvrit ce qu'on appelle maintenant la phagothérapie : « un microbe pathogène cause la maladie, un infiniment petit à son tour parasite le microbe pathogène, le dévore et le malade guérit » (1). Il n'eut de cesse dès lors d'étudier le comportement de ce « destructeur de bactéries » qu'il dénomma «bactériophage», afin de tirer le meilleur parti de cet « instrument de guérison ».

Nommé docteur en médecine *honoris causa* de l'Université de Leyde en 1923, il eut l'occasion d'expérimenter sur l'Homme la phagothérapie à large échelle avec un certain succès, notamment en Égypte et en Inde. Avant 1940, plus d'une centaine de publications font état de l'utilisation de la phagothérapie chez l'Homme pour traiter des infections dysentériques bacillaires, le choléra, des affections cutanées staphylococciques, des bactériémies à *Staphylococcus*, des péritonites, des méningites, des infections urinaires et des infections à *Neisseria gonorrhoeae*(2).

Cependant, à la même époque, l'attention commençait à se focaliser en Occident sur des molécules produites par des micro-organismes, les antibiotiques, pour se défendre des bactéries présentes dans l'environnement. Ces antibiotiques connurent le développement et l'engouement que l'on sait tandis que la phagothérapie était délaissée en Occident. Seuls quelques pays d'Europe de l'Est, au premier rang desquels la Géorgie, ont fait perdurer la phagothérapie. À Tbilissi, le centre Eliava, créé en 1923 en collaboration avec F d'Hérelle, produit encore aujourd'hui des cocktails de bactériophages vendus librement en pharmacie.

2. Le succès des antibiotiques et leur revers

Très vite, les antibiotiques ont été produits à une échelle industrielle et utilisés pour traiter les infections humaines aussi bien que pour prévenir et traiter les infections des animaux de rente.

Cependant cette utilisation massive d'antibiotiques a fait émerger des bactéries présentant des phénotypes de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Cette capacité qu'ont les bactéries à développer des mécanismes de résistance aux antibiotiques n'était certes pas nouvelle : les antibiotiques étant au départ produits par des micro-organismes présents dans l'environnement pour se défendre contre les bactéries, celles-ci avaient déjà eu l'occasion de développer ces mécanismes. Dès les années 1960, dans des fermes d'élevage intensif au Royaume-Uni, des bactéries résistantes à la pénicilline ont été la cause d'épidémies(3).

Dans un premier temps, la découverte de nouveaux antibiotiques dans l'environnement s'ajoutant aux sulfamides et à la pénicilline déjà utilisés, dont la streptomycine et la tétracycline, a permis de contourner les résistances bactériennes (Figure 1). La production par la suite d'antibiotiques de synthèse ou semi-synthétiques a complété l'arsenal thérapeutique des cliniciens, permettant de repousser le problème sans avoir à modifier les politiques d'administration des antibiotiques aussi bien à l'Homme qu'aux animaux de rente.

Élément sous droits, diffusion non autorisée.

Figure 1 : Dates de mise sur le marché de différents antibiotiques (en haut en bleu) et date de mise en évidence de résistance aux antibiotiques (en bas en rouge). D'après (4)

Alors que de plus en plus de bactéries -commensales comme pathogènes- se révélaient résistantes aux antibiotiques, l'industrie pharmaceutique a réduit ses efforts de recherche et de développement de nouveaux antibiotiques au profit d'autres champs de recherche, tels que la diabétologie et la cancérologie, dorénavant plus porteurs en raison du vieillissement de la population (Figure 2).



Elément sous droits, diffusion non autorisée.

Figure 2 : Nombre d'antibiotiques mis sur le marché après approbation de la FDA (U.S. Food and Drug Administration) . D'après (4)

Face à cette situation, les premières actions gouvernementales françaises se sont cependant limitées au champ des infections nosocomiales. En 1994, un premier plan était lancé pour renforcer les mesures d'hygiène hospitalière alors que les politiques d'administration des antibiotiques à l'Homme comme aux animaux d'élevage n'étaient toujours pas remises en cause. De leur côté, des chercheurs ont entrepris des travaux sur les mécanismes de résistance, leur support génétique -chromosomique ou plasmidique- et leur transmission -verticale ou horizontale- y compris entre différentes espèces.

Puis, à la fin des années 1990, l'augmentation croissante de souches de pneumocoques résistantes à la pénicilline a fait prendre conscience de l'urgence d'aller plus loin. En 2002, le gouvernement français a lancé la campagne « les antibiotiques c'est pas automatique » et depuis 2006, un règlement européen interdit d'utiliser dans les aliments pour animaux des additifs antibiotiques, à effet de facteur de croissance.

La relative diminution de la consommation d'antibiotiques qui s'en est suivi n'a pas empêché l'émergence de bactéries multi-résistantes puis hautement résistantes voire toto-résistantes aux antibiotiques.

3. Les alternatives aux antibiotiques

C'est dans ce contexte d'une résistance aux antibiotiques dont on ne voit pas la fin que d'autres thérapeutiques antibactériennes, dont la phagothérapie, suscitent un intérêt croissant :

- Les anticorps

Les anticorps monoclonaux sont développés depuis 30 ans pour traiter des affections cancéreuses, hématologiques, inflammatoires et auto-immunes notamment. En infectiologie aussi, on pourrait utiliser des anticorps pour combattre des infections bactériennes. Les anticorps développés par des patients infectés pourraient par exemple être réutilisés chez d'autres patients. C'est ce qui a été proposé dans un modèle expérimental murin de tuberculose, où des anticorps sélectionnés chez un patient humain a permis de diminuer la charge bactérienne chez la souris lorsque ces anticorps étaient administrés avant l'inhalation de bacilles tuberculeux (5). Cette pratique est peu développée et il n'existe pas d'anticorps commercialisé actuellement pour traiter une infection, mais elle demeure une piste à ne pas négliger.

- Les peptides anti-microbiens :

Les peptides anti-microbiens sont des peptides de moins de 60 acides aminés dont les premiers ont été découverts dans l'environnement où ils participent au système immunitaire de micro-organismes pour lutter contre les bactéries, champignons, parasites et virus (6). Plus de 3000 ont déjà été découverts et ont les mêmes cibles que les antibiotiques. D'ailleurs, la Colistine, peptide anti-microbien cyclique, est présenté comme un antibiotique de dernier recours dans certaines infections sévères. La Daptomycine, la Vancomycine et ses dérivés sont également rapprochés par certains de la catégorie des peptides anti-microbiens (7). Les problématiques rencontrées dans l'utilisation des peptides anti-microbiens sont leur toxicité pour les cellules eucaryotes, leur instabilité à bas pH, leur inactivation par le sérum ou les protéases, et leur coût de production élevé à partir d'organismes vivants. Les champs d'application les plus avancés en recherche médicale sont ceux des traitements locaux des infections bucco-dentaires, ophtalmologiques, ou encore de paroi post-opératoires. En

dehors de la Colistine, les peptides anti-microbiens développés à ce jour ciblent les bactéries à Gram positif. L'autorisation la plus récente délivrée par la Food and Drug Administration (FDA) pour un peptide anti-microbien date de 2014.

- Les probiotiques

Les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent une action bénéfique sur la santé de l'hôte » (définition de l'Organisation Mondiale de la Santé). Les probiotiques sont consommés majoritairement dans l'alimentation ou en tant que complément alimentaire, ce qui n'exige pas d'autorisation de mise sur le marché, mais certains ont été plus récemment formulés en médicament à visée digestive (8).

- Le transplant fécal

La transplantation fécale consiste en l'administration par voie digestive (orale, duodénale ou colique) d'une préparation de matière fécale issue d'un donneur sain à un patient atteint d'une pathologie intestinale pour laquelle le microbiote digestif est altéré, comme une colite récidivante à *Clostridioides difficile*. L'effet spectaculaire de cette thérapeutique (9) est rapporté à la colonisation des niches écologiques vacantes par les bactéries du donneur, empêchant la prolifération de *C. difficile*. D'autres hypothèses sont néanmoins avancées, parmi lesquelles la présence de nombreux bactériophages dans le matériel transplanté (10).

B. La phagothérapie : une alternative prometteuse aux antibiotiques

1. Qu'est-ce qu'un bactériophage ?

Un bactériophage est un virus capable d'infecter spécifiquement une bactérie. On estime que la Terre compte environ 10^{31} bactériophages soit 10 à 100 fois plus que de bactéries (11). C'est l'entité biologique la plus représentée sur Terre. Leur génome, de taille très variable (de 2.4 à 735 kb) est constitué d'ARN ou d'ADN, simple ou double-brin.

Les bactériophages utilisés en phagothérapie appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*, qui regroupent les sous-familles de bactériophages à queue : *Myoviridae*, *Podoviridae*, et *Siphoviridae*. Ces sous-familles, caractérisées par leur morphologie, ne constituent pas des groupes monophylétiques et comprennent donc une grande diversité de bactériophages. Il est actuellement proposé de recourir à la proximité génétique pour établir de nouvelles familles au sein des *Caudovirales* (Figure 3).

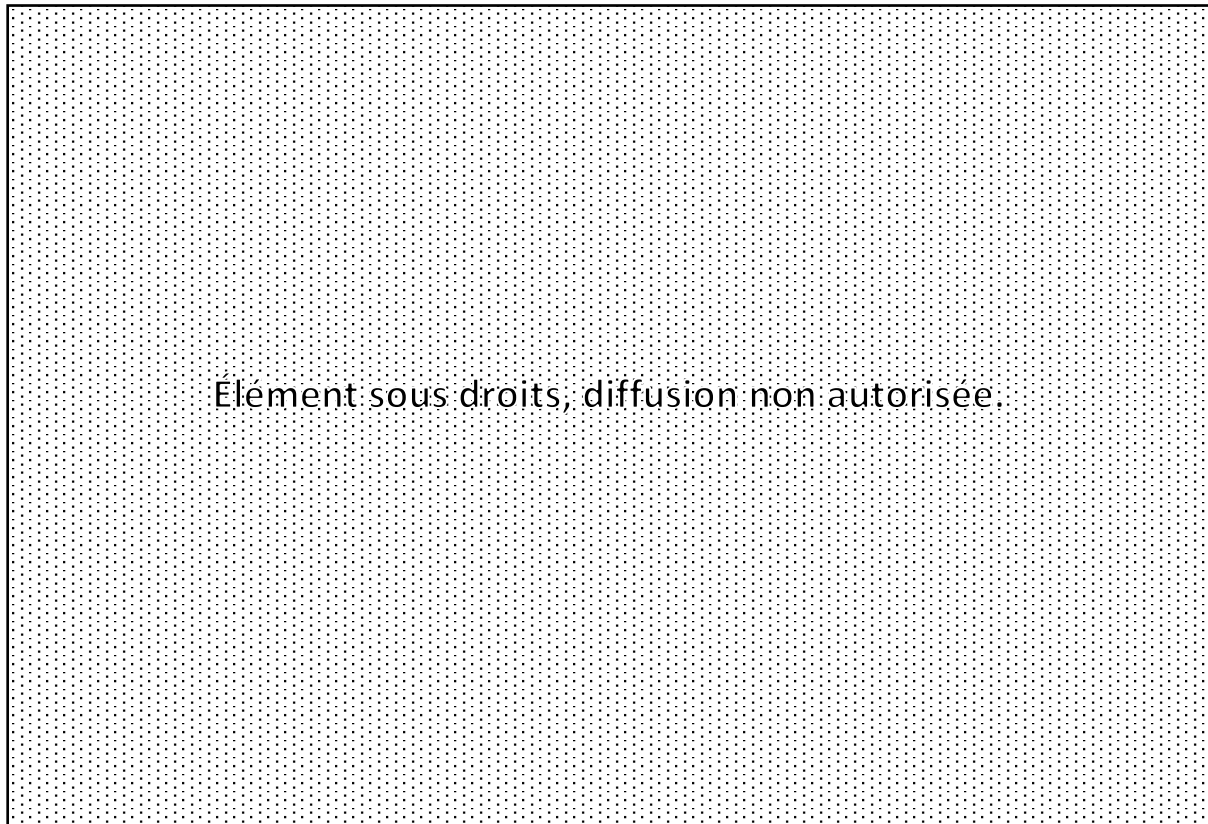


Figure 3 : Virus à ADN double brin de procaryotes et archées mettant en évidence l'absence de correspondance entre phylogénie et morphologie. Dendrogramme généré par GRAViTY utilisant iTOL (12).

Le séquençage du génome des bactéries a confirmé que nombre d'entre elles abritent un à plusieurs prophages. Ces prophages insérés dans le matériel génétique de la bactérie y restent temporairement immobilisés lors du cycle dit lysogénique. Sous l'effet d'un stress, les prophages peuvent s'exciser et enclencher une phase reproductive aboutissant à la formation de nouveaux virions qui seront libérés lors de la lyse de la cellule bactérienne. Les bactériophages capables de prendre la forme de prophages et ainsi d'effectuer des cycles d'infection lysogéniques et lytiques, sont qualifiés de tempérés (Figure 4). Lors de l'excision des prophages, il peut se produire des erreurs d'encapsidation avec du matériel génétique de la bactérie qui prend la place du génome du bactériophage. Ces erreurs sont responsables de ce que l'on appelle la transduction du matériel génétique d'une bactérie à une autre. De tels événements favorisent grandement le transfert horizontal de gènes tels que ceux codant des facteurs de virulence, des toxines ou encore des gènes de résistance à des antibiotiques.

Il existe aussi des bactériophages qualifiés de virulents qui ne peuvent adopter qu'un cycle lytique. Ce sont ces bactériophages qui sont susceptible d'être utilisés en phagothérapie car

ils ne peuvent pas insérer leur génome dans celui des bactéries, ce qui diminue considérablement les risques de transduction.



Figure 4 : Cycles lytique et lysogénique que peuvent adopter les bactériophages tempérés. Alors que le cycle lysogénique permet à la bactérie de survivre, le cycle lytique conduit à la lyse bactérienne et au relargage de plusieurs nouveaux virions. De (13)

2. Comment discriminer un bactériophage virulent d'un tempéré ?

L'analyse de leur génome permet de discriminer les bactériophages tempérés. En effet, les gènes impliqués dans le processus de lysogénie, soit l'insertion d'un prophage dans le génome bactérien, sont connus. Des outils informatiques tels que PHACTS permettent cette discrimination (14). PHACTS permet aussi d'écarter un bactériophage dont le génome coderait pour des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques.

3. La caractérisation de l'effet antibactérien des bactériophages

Le cycle lytique des bactériophages conduit à la lyse de la bactérie et à la libération de virus néoformés prêts à infecter de nouvelles bactéries.

Le cycle infectieux est composé de trois phases qui permettent de caractériser les interactions d'un bactériophage avec une bactérie donnée. La phase d'adsorption correspond à la rencontre spatiale entre le bactériophage et la bactérie et à l'accrochage du phage par des protéines de queue sur des récepteurs bactériens spécifiques. Cette phase, qui répond à la loi d'action des masses, est caractérisée par la constante d'adsorption et dépend de la densité de bactéries-cibles. La phase d'éclipse correspond au temps durant lequel la bactérie voit sa machinerie cellulaire détournée par le bactériophage pour produire de nouveaux virions. La phase de latence correspond au temps d'apparition dans le milieu extracellulaire de nouveaux virions, témoins de la lyse de la bactérie. Au terme du cycle infectieux il est possible d'estimer le nombre de nouveaux virions produits par bactérie, qu'on appelle le rendement de la lyse (burst-size).

La phase d'éclipse, la phase de latence et le rendement de la lyse peuvent être estimés par une expérience dite du cycle unique (one-step-growth) dont le principe est le suivant. Des bactéries en excès sont mises en présence d'une quantité donnée de phages dans un milieu de culture, à température et agitation optimales pour favoriser la rencontre du ligand (le bactériophage) à son récepteur (la bactérie). Après la phase d'adsorption qui est souvent assez courte (moins de 5 min), le milieu est dilué pour éviter de nouvelles interactions bactériophages-bactéries. On mesure alors de façon rapprochée le nombre de bactériophages dans la solution, que ce soit dans le milieu extracellulaire -pour mesurer la durée de la phase de latence- et dans la solution totale après lyse de la paroi bactérienne avec du chloroforme. La détection de l'augmentation de bactériophages dans le milieu extracellulaire signe la fin de la période de latence (Figure 5).

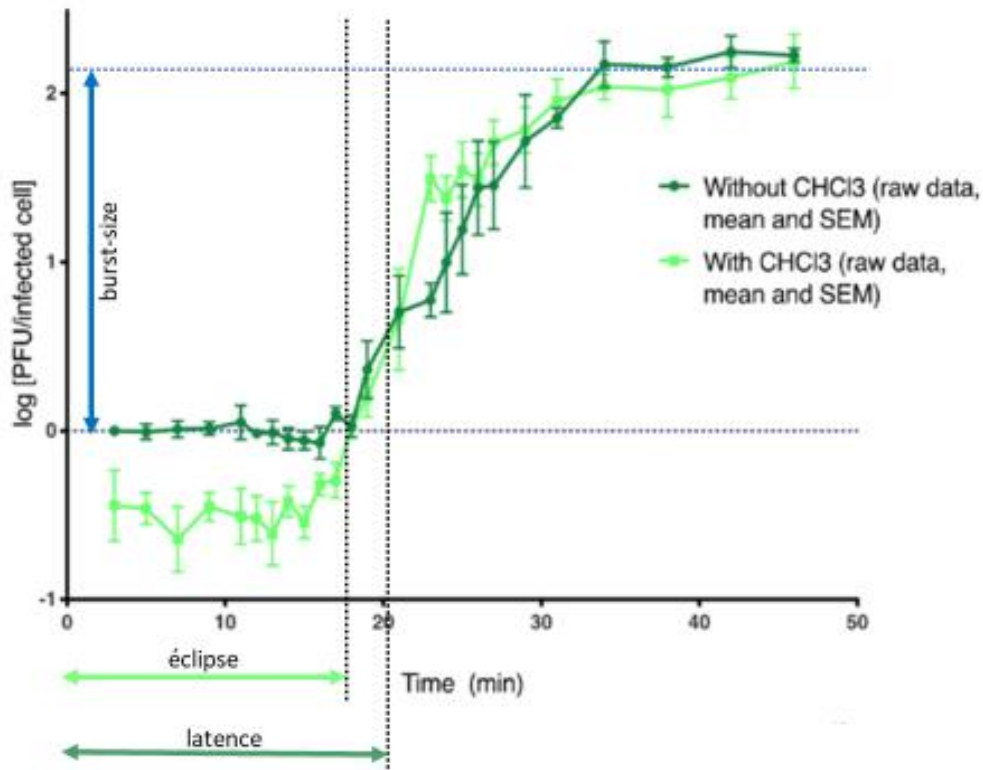


Figure 5 : Exemple d'expérimentation de one-step-growth du couple 536/536_P1.

Cette capacité du bactériophage à détruire *in vitro* les bactéries est à la base du principe de la phagothérapie. Elle se retrouve *in vivo* dans les modèles animaux, même si la transposition du tube à essai au modèle animal nécessite de prendre en compte la complexité de chacun des acteurs – bactéries, bactériophages et hôte. Les bactéries, en effet, n'ont pas le même comportement dans un milieu nutritif agité que dans un tissu animal où les bactériophages doivent rejoindre le site infectieux avec de plus un hôte qui dispose de mécanismes de défense contre les bactéries et contre les bactériophages.

4. L'efficacité dans les modèles animaux

La littérature fait état de nombreux succès enregistrés par la phagothérapie dans les modèles animaux, depuis les expériences menées par Dubos et Morton dans les années 1940 (15,16) jusqu'aux modèles plus complexes d'aujourd'hui (17).

Ces études de phagothérapie expérimentale peuvent être classées en fonction des animaux utilisés, qu'il s'agisse d'animaux de laboratoire (essentiellement souris, rats, lapins) ou d'animaux destinés à la consommation (essentiellement poulets, bœufs, moutons et porcs).

Dans ce dernier cas, la restriction de l'utilisation des antibiotiques en élevage a incité les chercheurs à proposer les bactériophages pour traiter les infections bactériennes se développant au cours de l'élevage. Les pathologies ciblées sont principalement la salmonellose, la colibacillose aviaire, les infections à *Campylobacter*, ainsi que les infections à *Clostridium perfringens* chez le poulet (18–20).

Les animaux de laboratoire sont, quant à eux, utilisés pour tenter de reproduire et traiter certaines infections humaines. Il s'agit d'apprécier l'efficacité de la phagothérapie et d'en comprendre les limites dans des modèles d'infections pulmonaires (21–23), de bactériémies (24,25), d'endocardites (26,27), de méningites (15), d'infections digestives ...

Les schémas expérimentaux suivent la trame suivante : chez une espèce choisie, on inocule à plusieurs animaux une dose souvent létale d'une bactérie donnée avant d'en traiter certains par une dose prédéterminée d'un ou plusieurs bactériophages (par une voie d'administration systémique ou locale), et d'autres par l'antibiotique de référence et/ou par un placebo. Les animaux sont sains ou présentent différents types d'immunosuppression. L'efficacité est avant tout appréciée par la diminution de la mortalité des animaux infectés. Dans certaines études les auteurs sont allés plus loin et ont suivi la charge bactérienne et/ou la concentration en bactériophages dans différents compartiments de l'organisme : sang, foie, rate,... et les organes siège de l'infection.

L'efficacité de la phagothérapie est avérée. On comprend néanmoins que la diversité des modèles animaux infectieux et les modalités différentes d'administration de bactériophages, qui de plus sont eux-mêmes différents, rendent difficile l'analyse comparative entre les études.

5. Et chez l'Homme ?

Les nombreuses études publiées avant 1940 et rapportant des cas cliniques ou des essais sur l'Homme offrent des résultats encourageants mais contrastés (2). L'absence de groupe contrôle lors des essais empêche souvent l'interprétation des résultats. Pendant la Guerre Froide, la majeure partie des travaux effectués chez l'Homme ont eu lieu dans l'ex-bloc soviétique et les résultats, ont été publiés pour la plupart en russe. Il s'agit d'ailleurs

majoritairement de cas cliniques rapportés ou d'essais, là encore, non contrôlés au regard des règles en vigueur actuellement (28).

Depuis la fin des années 1990 sont rapportés dans la littérature un nombre croissant de cas de patients traités par phagothérapie. Ces cas cliniques concernent aussi bien des infections cutanées (29,30), intestinales (31), cérébro-méningée (32), ostéoarticulaires (33,34) ou urinaires (35,36). Certains concernent des infections difficiles à traiter du fait de la localisation du site infectieux (37), difficilement accessible, ou la résistance de la bactérie causale aux antibiotiques (38,39).

Bien que prometteuses, ces données peinent à convaincre totalement scientifiques, médecins et autorités de santé compte tenu de la difficile interprétation de cas cliniques isolés. En effet, le recours aux essais cliniques contrôlés est la méthode habituelle de preuve d'efficacité d'un traitement. Jusqu'à présent les essais réalisés en phagothérapie et répondant aux standards sont :

- PhagoBurn, qui est un essai contrôlé ouvert, où des patients atteints de brûlures cutanées infectées ont été traités par le traitement standard antibactérien non spécifique (Sulfadiazine) ou par un cocktail de bactériophages ciblant *P. aeruginosa* (12 bactériophages) appliqués de façon topique (40,41). Bien qu'aucun élément de toxicité imputable aux bactériophages n'ait été reporté, l'essai clinique a été interrompu précocement du fait d'une difficulté de recrutement des patients et d'une efficacité prouvée moindre du traitement par phagothérapie. Cet échec peut s'expliquer par le fait que la sensibilité des souches causales n'avait pas été testée avant l'application des bactériophages. De plus, un problème de stabilité des bactériophages avait conduit à une diminution drastique de leurs concentrations dans les solutions appliquées (jusqu'à une perte de 10^5 PFU/mL de bactériophages par rapport aux concentrations souhaitées).
- Un autre essai clinique contrôlé a été réalisé au Bangladesh sur une population pédiatrique atteinte de diarrhée aiguë infectieuse (42). Il s'agissait d'une étude contrôlée randomisée en trois bras au cours de laquelle un cocktail de phages dit « T4-like » du Nestlé Research Centre était comparé au cocktail de phages ColiProteus (fourni par la société Microgen basée en Russie) et à un placebo chez des enfants de 6 à 24 mois présentant une diarrhée aiguë de moins de 48h. Sur un effectif

de 69 enfants (sur les 120 prévus) présentant une diarrhée à *E. coli* aucune variation significative n'a été constatée en termes de durée et gravité des symptômes. La puissance insuffisante de l'étude qui avait surestimée l'implication de souches d'*E. coli* dans cette pathologie et l'absence de données concernant l'efficacité *in vitro* des phages aux souches retrouvées sont invoquées pour expliquer l'absence d'effet objectivé.

- L'essai « BacterioPHAGE for Gastrointestinal Health 2 Study » a démontré l'effet d'un cocktail de bactériophages administré en compléments de probiotiques pour réduire l'irritation intestinale (43). Dans une étude contrôlée contre placebo d'une part et probiotiques seuls d'autre part, 66 patients ont été randomisés, suivis en double insu pendant 4 semaines avec une prise orale quotidienne d'un des trois produits, et analysés. De nombreux critères subjectifs de douleurs, de confort intestinal, d'aspect des fèces, etc, étaient évalués par les patients quotidiennement. Parmi tous les critères, le confort intestinal était supérieur statistiquement dans le groupe probiotiques + bactériophages par rapport aux deux autres groupes. Les autres critères de jugement n'étaient pas statistiquement différents.
- Un essai géorgien a comparé un des cocktails du centre Eliava, « Pyophage », à un placebo ou au traitement standard par antibiotiques pour traiter des infections ou colonisations urinaires chez des patients en péri-opératoire de résection de prostate (44). L'étude n'a pas pu mettre en évidence de différence significative d'efficacité entre les antibiotiques, les bactériophages et le placebo, mais l'étude souffrait d'un manque de puissance, et le même cocktail de bactériophages avait été administré quelle que soit la bactérie causale.
- Un essai anglais contrôlé, randomisé, en double insu, sur des otites externes chroniques à *P. aeruginosa* a comparé l'application topique d'un cocktail de 6 bactériophages anti-*P. aeruginosa* à un placebo sur un petit effectif de patients (24 au total). Les patients comme les cliniciens ont relevé une diminution plus importante des symptômes chez les patients traités par bactériophages (45).

La difficulté de transposer dans des essais contrôlés sur l'Homme l'efficacité de la phagothérapie observée *in vitro* et chez l'animal met en lumière les limites des modèles expérimentaux qui sont souvent optimisés par rapport à la réalité clinique. Cette problématique semble moindre en antibiothérapie ce qui souligne un manque de compréhension des paramètres l'efficacité des bactériophages en pratique clinique.

C. Les bactériophages : un médicament pas comme les autres

1. Un spectre d'action bien plus étroit que celui des antibiotiques

Les bactériophages, pour s'adsorber sur la paroi bactérienne, utilisent une reconnaissance spécifique type « ligand-récepteur ».

Les ligands, s'agissant des bactériophages, sont des protéines de queue susceptibles de se lier à une molécule de la surface bactérienne. Certains bactériophages monovalents ne peuvent se fixer que sur un récepteur alors que les bactériophages polyvalents peuvent exprimer concomitamment ou séquentiellement jusqu'à 5 protéines de liaison à des récepteurs (46).

Les récepteurs classiquement décrits chez la bactérie sont composés de protéines ou d'oligosaccharides, ou d'assemblage de ces deux composants. Il s'agit pour les bactéries à Gram négatif, du Lipopolysaccharide (LPS), de la capsule, des protéines de la membrane externe, ainsi que des protéines de la flagelle ou du pilus.

C'est cette reconnaissance spécifique « ligand-récepteur » qui explique principalement le spectre d'hôte étroit (« host-range ») du bactériophage qui va souvent au-delà de l'espèce bactérienne ; ainsi un bactériophage ciblant *E. coli* ne va généralement être actif que contre quelques souches de cette espèce (47). Les autres déterminants du spectre d'hôte, que sont les mécanismes bactériens de résistance intracellulaires, jouent un moindre rôle dans la variabilité des spectres d'hôtes des bactériophages, comme montré par Gencay et al (46). Un nombre réduit de bactériophages différents suffit à tuer toutes les souches des espèces bactériennes qui ont un moindre polymorphisme de paroi. C'est le cas par exemple de *Staphylococcus aureus* dont 95% des souches sont lysées par seulement 3 bactériophages (cocktail de ArmataPharama, AP-SA02).

Ce spectre d'hôte des bactériophages, bien plus étroit que celui des antibiotiques, est le frein principal au déploiement d'une phagothérapie prête à l'emploi. Le regain d'intérêt pour la phagothérapie a provoqué ces dernières années un effort sans précédent pour isoler et caractériser des bactériophages infectant des bactéries pathogènes. Mais, si le génome de ces bactériophages est souvent déposé dans les bases de données publiées, leur spectre d'hôte

demeure en général enfoui dans les données supplémentaires des articles et ne sont pas facilement exploitables.

Pour permettre de repérer rapidement le bactériophage qui infecte une bactérie donnée et déterminer son spectre d'hôtes, notre laboratoire a récemment développé une base de données disponible sur internet (<https://viralhostrangedb.pasteur.cloud/>) où sont déposées les informations obtenues sur les spectres d'hôte des différents bactériophages étudiés (Figure 6).

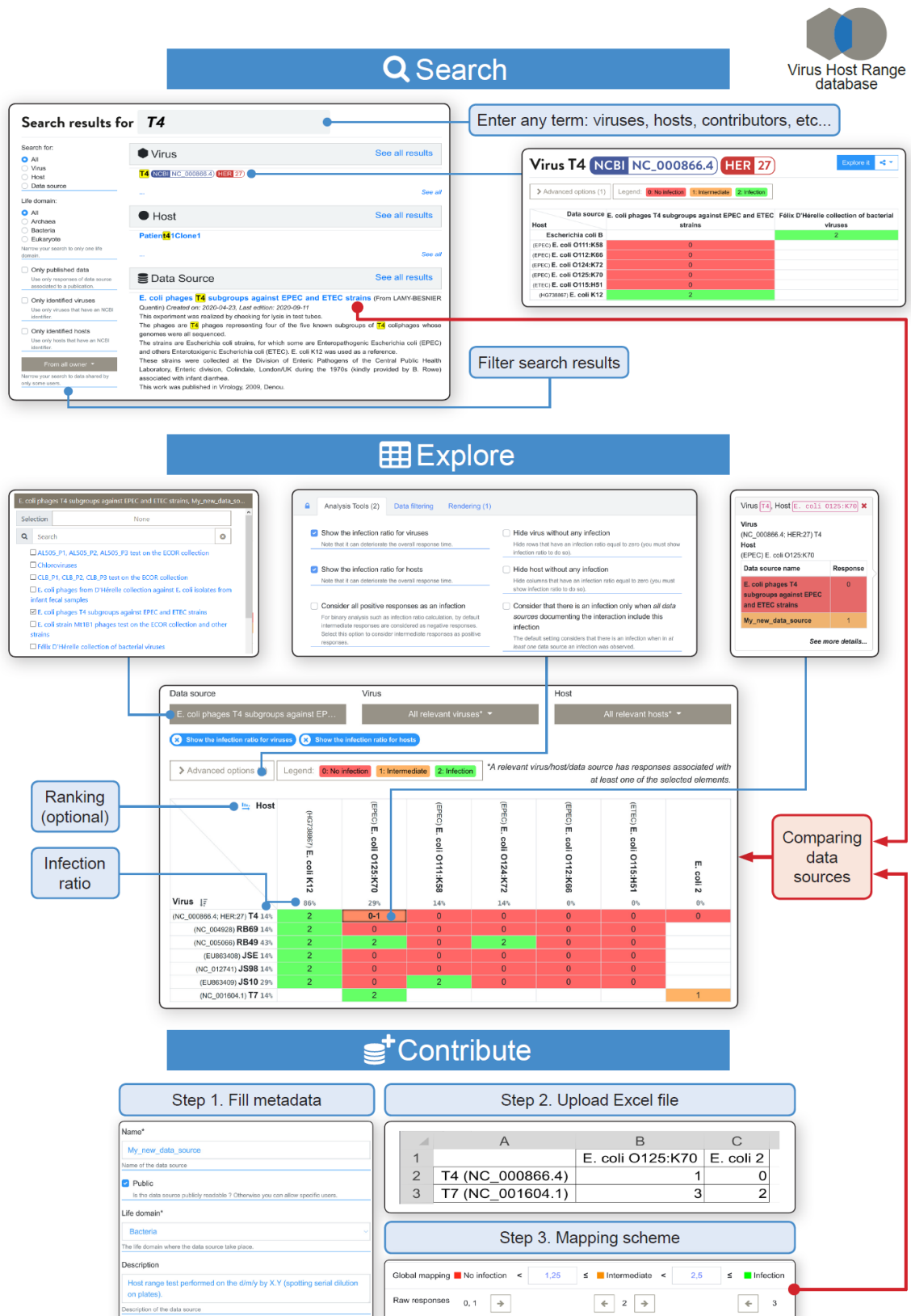


Figure 6 : Mode de fonctionnement de la Virus Host Range Data Base, hébergée par l'Institut Pasteur.

Bien que les données disponibles soient encore limitées, cette base donne des informations facilement accessibles sur les spectres d'hôte de certains bactériophages, comme par exemple ceux infectant les différentes souches de *S. aureus* (Figure 7) ou de *E. coli* (Figure 8).

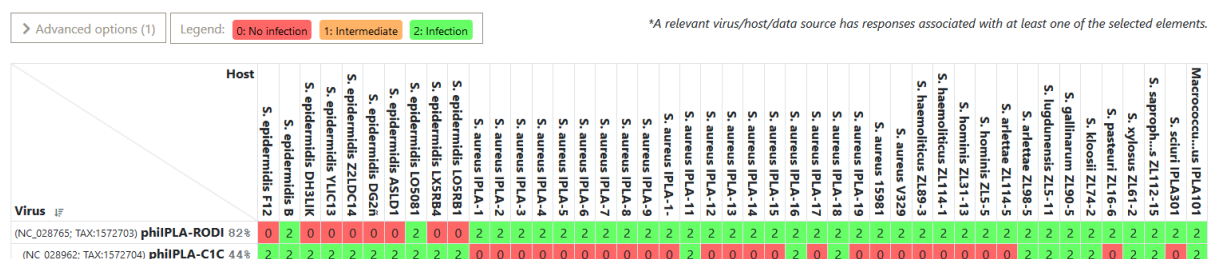


Figure 7 : Spectres d'hôtes des bactériophages philPLA-ROD1 et philPLA-C1C contre différentes souches de *Staphylococcus*.



Figure 8 : Spectres d'hôtes des bactériophages RB49, JS98, JS10, T4, RB69 et JSE contre différentes souches de *E. coli*.

Les résultats donnés en exemple confirment les observations publiées dans la littérature à propos du spectre d'hôte des bactériophages infectant les bactéries à Gram positif, qui est généralement plus étendu (ici 84 % des souches de *S. aureus* pour le bactériophage philPLA-ROD1) que le spectre d'hôte de bactériophages infectant des bactéries Gram négatif (ici 35 % des souches de *E. coli* pour le bactériophage RB49).

On sait, de façon empirique, qu'il est possible d'élargir le spectre d'action d'une solution de bactériophages en y mélangeant des bactériophages différents. Nous avons donc cherché à savoir s'il était possible de réaliser un cocktail de bactériophages qui couvrirait l'ensemble des souches d'*E. coli* responsables d'infections hospitalières.

2. À la recherche du cocktail anti-*E. coli* :

L'expérience en laboratoire, menée dans un premier temps par N. Dufour, s'est déroulée de la façon suivante. N. Dufour a d'abord isolé dans des eaux usées de nombreux bactériophages ciblant une collection de souches cliniques d'*E. coli*, obtenus à partir de prélèvements respiratoires.

Au laboratoire, N. Dufour avait à partir d'eaux usées isolé de nombreux bactériophages ciblant des souches cliniques d'*E. coli* de la collection EcoPAVM1. Il est en effet nécessaire, en vue d'une application clinique, de tester les bactériophages uniquement sur des souches isolées chez des patients, les bactéries « de laboratoire » ayant pu perdre certains systèmes de résistance. Après avoir isolés des bactériophages potentiellement d'intérêt, on dépose des gouttes de ces bactériophages sur des surcouches bactériennes en phase exponentielle.

Puis N. Dufour a déposé des gouttes de ces différents bactériophages sur des surcouches bactériennes en phase exponentielle de souches de la collection EcoPAVM2 et en a observé l'aspect une dizaine d'heures plus tard. Les plaques claires traduisent la lyse des bactéries, et l'absence de plaque visible l'inefficacité des bactériophages. L'effet est parfois intermédiaire avec un aspect turbide de la plaque (Figure 9).

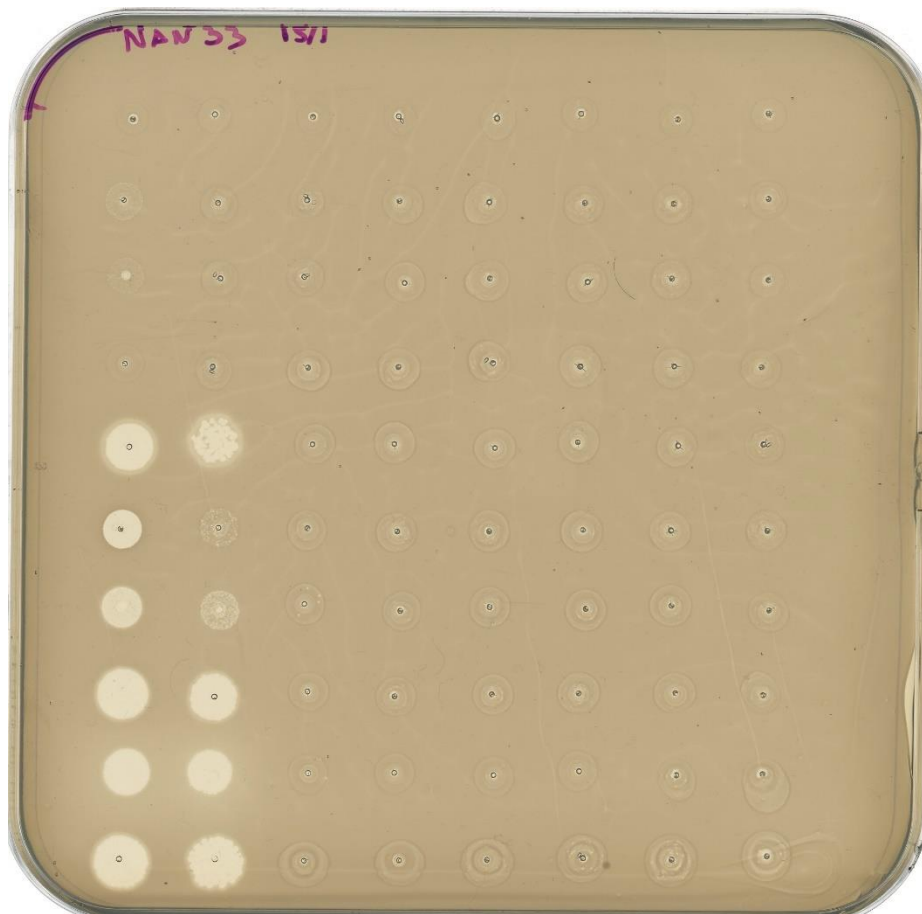


Figure 9: Exemple de spot-test de 80 bactériophages testés sur une surcouche bactérienne d'*E. coli*. Certains bactériophages entraînent une lyse bactérienne franche tandis que d'autres sont sans effet ou avec un effet intermédiaire.

Mettant dans une même solution les bactériophages qui avaient le spectre le plus large, N. Dufour avait confectionné un cocktail de 5 bactériophages.

J'ai, durant mon année de Master 2, testé ce cocktail sur une autre collection de souches cliniques (EcoPAVM3) et obtenu la lyse de 69% des souches. Voulant étendre le spectre du cocktail, j'ai recherché de nouveaux bactériophages ciblant les souches d'*E. coli* qui n'étaient pas couvertes par le premier cocktail et ai choisi parmi les bactériophages isolés 5 nouveaux bactériophages.

Ce nouveau cocktail de 10 bactériophages permettait de couvrir 74% des 113 souches d'une troisième collection de souches d'*E. coli* cliniques (EcoRespiBCH) (Figures 10 et 11).

Ainsi, administrer à un patient un cocktail sans s'être assuré au préalable de son efficacité en réalisant un test de sensibilité avec la bactérie ciblée, n'est pas la bonne approche. Bien des échecs en phagothérapie humaine s'explique par une inadéquation entre le ou les bactériophages(s) utilisé(s) et la bactérie ciblée (40,42).

Ce spectre d'hôte étroit, s'il peut être perçu comme une embûche au déploiement large de la phagothérapie, rassure en revanche sur l'épargne du microbiote. Même si certains bactériophages ont la possibilité d'infecter des espèces de bactéries différentes, notamment au sein des bacilles à Gram négatifs (48), la modification du microbiote, digestif notamment, après un traitement à base de bactériophages est bien moindre que celui d'un traitement antibiotique (49).

3. La résistance des bactéries aux bactériophages : un problème insurmontable ?

L'étroitesse du spectre d'hôte est indissociablement liée à la résistance des bactéries aux bactériophages. La présence de bactériophages dans l'environnement est un des principaux moteurs de l'évolution bactérienne (50) et de leur diversification. Bactériophages et bactéries co-évoluent sur un modèle de prédation depuis plusieurs milliards d'années et de nombreux mécanismes de résistance interviennent aux différentes étapes-clés du cycle infectieux (51). Ces mécanismes sont succinctement repris ici.

La majorité des mutations fixées génétiquement chez les bactéries concernent celles de leurs récepteurs qui sont ciblés par les bactériophages, qui se trouvent alors modifiés, supprimés ou masqués. D'autres mécanismes sont à l'œuvre pour limiter l'adsorption des bactériophages sur la bactérie : les « Outer Membrane Vesicles », sur lesquelles peuvent se trouver piégés les bactériophages, sont sécrétées naturellement par les bacilles à Gram négatif. Les autres étapes du cycle infectieux sont également ciblées par des mécanismes de résistance. L'injection du génome du bactériophage peut être bloquée par la « SuperInfection Exclusion ». Le génome injecté peut-être clivé par différents systèmes de restriction-modification ou par des systèmes CRISPR-Cas. La réplication de l'ADN du bactériophage peut être inhibée par méthylation et l'assemblage des protéines structurales du bactériophage peut être empêché. Le séquençage à haut débit a permis de mettre en évidence de tels

systèmes de défense anti-bactériophages et l'avalanche de séquences bactériennes et virales détectées avec cette méthode donne matière à proposer de nouveaux mécanismes de résistance, dont certains ont été expérimentalement vérifiés (Figure 12) (52).

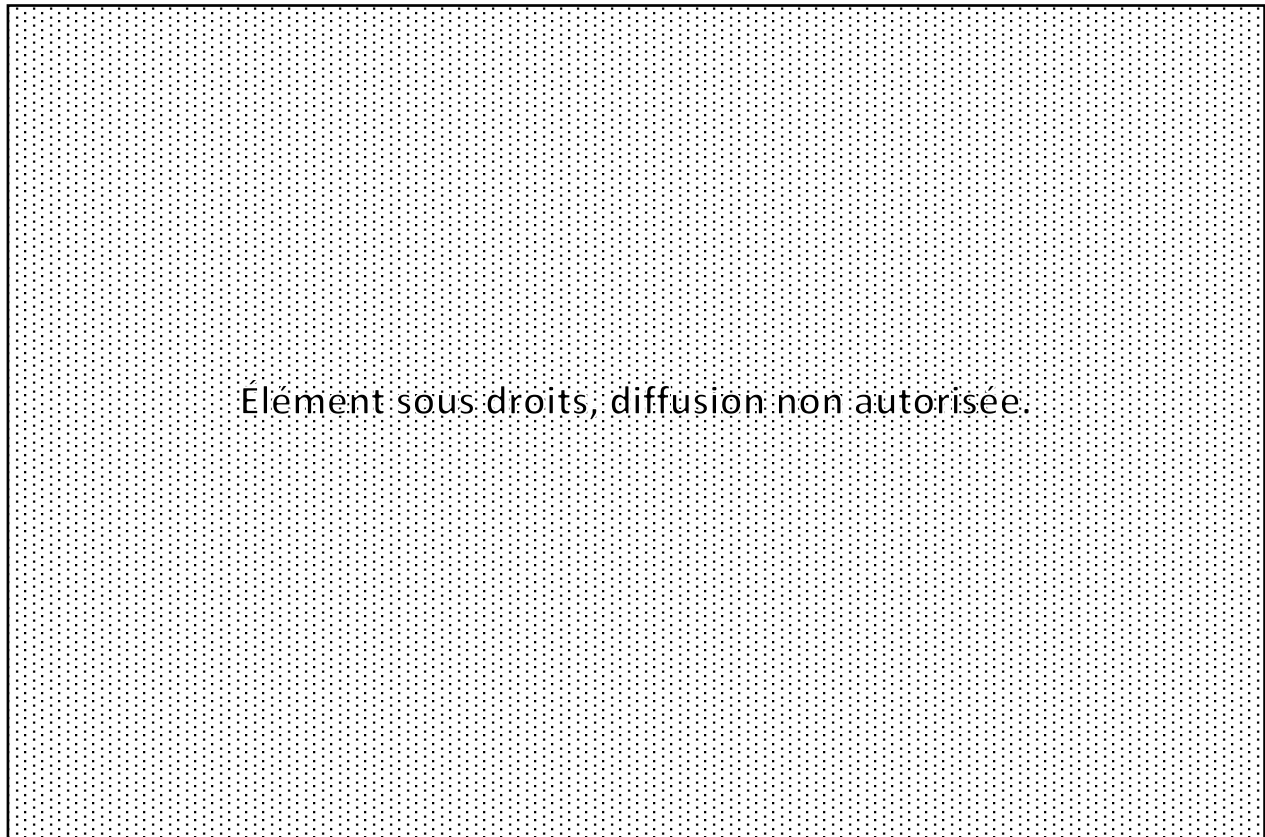


Figure 12 : Schéma des systèmes bactériens de défense antivirale. De (53)

Les résistances bactériennes observées n'ont pas toutes de support génétique. Lors de phénomènes dits de « variation de phase », des modifications transcriptionnelles peuvent conduire à des résistances phénotypiques aux bactériophages (54,55). Les bactéries sont alors capables de perdre leur résistance après la levée de la pression de sélection. Parmi les mécanismes de résistance partielle résultant de phénomènes phénotypiques on mentionne l'hyperproduction de mucus qui permet une protection partielle contre l'attaque des bactériophages (56).

Dans une population bactérienne issue d'un même clone sensible à un bactériophage donné, il existe souvent une ou plusieurs bactéries qui sont d'emblée résistantes au bactériophage. En effet, du fait d'erreurs de répllication de l'ADN, des modifications, intervenant le plus souvent chez la bactérie au niveau du récepteur ciblé par le bactériophage peuvent survenir.

La mesure de ce phénomène est donnée par la fréquence dite de « fluctuation » telle qu'elle ressort de l'expérimentation décrite par Luria et Delbrück (57).

L'émergence de bactéries résistantes aux bactériophages est rapide et inhérent à la coévolution bactériophage-bactérie *in vitro* (58). Pour les bactéries à croissance rapide, on l'observe généralement après les premières heures de co-évolution, où après une nette décroissance de la population bactérienne initialement en présence on observe une réaugmentation de la population bactérienne (Figure 13).

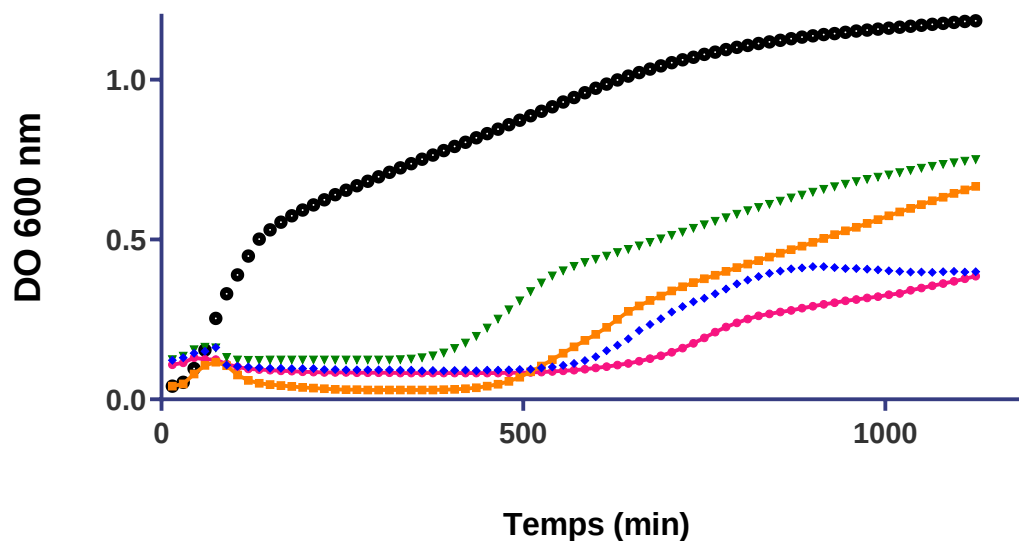


Figure 13 : Cinétiques de lyse de la bactérie 536 par le bactériophage 536_P1 (MOI initiale : 10 ; 4 réplicats indépendants). En noir : courbe de croissance de 536 sans bactériophages.

On ne peut pas d'emblée savoir s'il s'agit de la sélection de mutants résistants préalablement présents dans la population bactérienne ou si la résistance est d'ordre phénotypique par variation de phase. La mesure de la fréquence de fluctuation permet au moins partiellement de répondre à cette question. Reprenant l'expérience de Luria-Delbrück, j'ai calculé la fréquence de fluctuation de la souche 536 et ai trouvé une fréquence de $1-2 \times 10^{-6}$, compatible avec un phénomène de sélection de mutants résistants initiaux.

Le même phénomène a été relevé lors de différentes expérimentations *in vivo* (59) (60) ainsi qu'au cours d'un traitement chez l'Homme : le cocktail de phages avait dû être adapté à cause de la présence de bactéries devenues résistantes aux premiers bactériophages utilisés (61). Nous verrons dans la discussion comment ce phénomène peut être intégré au processus de phagothérapie.

4. Le rôle du système immunitaire

Alors que dans le cas d'un traitement antibiotique, le statut immunitaire ne semble pas déterminant pour le pronostic du patient (62), il semble déterminant en phagothérapie (63). Des études ont mis en évidence le rôle-clé joué par le système immunitaire au travers d'une action synergique avec le bactériophage utilisé (64). Ainsi la phagothérapie seule, souvent couronnée de succès chez l'animal immunocompétent, n'est pas toujours efficace chez l'animal immunodéprimé. Chez l'animal immunocompétent, la réduction rapide de la charge bactérienne par l'action du bactériophage permet au système immunitaire de prendre en charge les bactéries restantes, qu'elles soient sensibles ou devenues résistantes au bactériophage. Chez l'animal immunodéprimé, les bactéries devenues résistantes au bactériophage peuvent proliférer. En plus de l'effet additif du système immunitaire sur les bactériophages, il semblerait qu'une réelle synergie opère en phagothérapie (65). Un exemple éclairant est celui de Cai et al. qui a montré qu'une souche de *Klebsiella pneumoniae* devenue résistante à un bactériophage ciblant la capsule était devenue plus sensible à la phagocytose que la souche initiale (66).

Cet effet synergique probable entre le système immunitaire inné et les bactériophages est pris en compte dans le modèle utilisé dans notre étude partie II.B-2.

5. Un traitement sans toxicité retrouvée

Si les antibiotiques ont une toxicité rénale ou hépatique qui dépend de la famille d'antibiotique, rien de tel n'a jamais été rapporté pour les bactériophages du fait d'un métabolisme totalement différent (point abordé dans la partie II.B-1). Par ailleurs, la présence naturelle de multiples bactériophages dans l'organisme rassure sur la sécurité d'utilisation de ceux-ci.

Reste néanmoins la question de la quantité d'endotoxines, que sont les domaines hydrophobiques du lipopolysaccharide de la membrane externe des bactéries bacilles Gram négatif, libérées au cours de la lyse bactérienne provoquée par le bactériophage. Ce sujet est capital puisque la morbidité des infections bactériennes est notoirement due à la détection

par le système immunitaire des résidus bactériens, dont notamment ces endotoxines, qui entraîne une réponse inflammatoire majeure, parfois mortelle.

Afin de comparer les quantités d'endotoxines produites lors d'une antibiothérapie et lors d'une phagothérapie, et sachant que la quantité d'endotoxines libérées en cas de traitement antibiotique dépend de la classe de l'antibiotique retenu, nous avons effectué en laboratoire des expériences sur des souches cliniques de *E. coli*. Les souches 536 et LM33 ont été lysées individuellement par trois antibiotiques de deux classes différentes (deux β -lactamines et un aminoside) et deux bactériophages différents (536_P1 et LM33_P1). Les résultats sont publiés dans l'article de Dufour (67) (Annexe I). De ces expériences il ressort que les taux d'endotoxines que nous avons mesurés au cours de la lyse bactérienne par bactériophages ne diffèrent pas significativement de celles constatées en cas d'action de l'amikacine et sont même inférieures à celles provoquées par les β -lactamines.

Le recours à la phagothérapie consistant à administrer des virus au patient, se pose la question de la réponse immunitaire antivirale ainsi déclenchée chez celui-ci : cette réponse pourrait-elle majorer la réponse inflammatoire globale, ou bien détourner la réponse immunitaire antibactérienne vers cette réponse antivirale ? Pour répondre à ces questions, nous avons mené de nouvelles expérimentations et comparé les réponses cytokiniques d'animaux infectés par les souches de *E. coli* 536 et par LM33 administrées par voie nasale et traités respectivement par des bactériophages 536_P1 et LM33_P1 ou par des antibiotiques avec, d'une part, celles d'animaux infectés et non traités et, d'autre part, celles d'animaux sains recevant seulement des bactériophages (68) (Annexe II). Au cours de ce travail mené avec N. Dufour, j'ai réalisé les expérimentations animales et ai notamment effectué les prélèvements d'organes et les dosages de cytokines durant les premiers mois de ma thèse. Les mesures ont montré que l'administration de bactériophages à des animaux sains pouvait entraîner une augmentation locale (pulmonaire dans notre cas) de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire antivirale. Mais cet effet s'est révélé variable et n'a été décelé que pour un des deux bactériophages. L'augmentation constatée était par ailleurs modérée et bien inférieure à celle constatée lors d'infections à virus à tropisme eucaryote. Chez l'animal infecté, alors que les bactériophages se sont montrés aussi efficaces que les antibiotiques en termes de clairance bactérienne, il n'a pas été observé de différence dans la réponse inflammatoire à ces deux traitements.

Nos travaux, bien que nécessitant d'autres études pour pouvoir en généraliser les messages, tendent donc à prouver une absence de toxicité particulière des bactériophages. Leur efficacité n'étant par ailleurs plus à prouver, des schémas thérapeutiques permettant leur emploi dans un cadre juridique certain devraient être définis sans plus tarder afin de pallier les impasses thérapeutiques auxquelles les médecins se trouvent de plus en plus souvent confrontés.

Avant d'aborder les aspects juridiques, il convient de faire un état des lieux des possibilités d'accès à des bactériophages.

D. Un accès limité aux bactériophages

Il est actuellement difficile de pratiquer la phagothérapie, du fait du statut actuel des bactériophages au regard de la réglementation européenne des produits de santé. Aux États-Unis, en Europe et en Asie, des Centres ou d'Instituts abritent des banques, plus ou moins fournies, de bactériophages disponibles à l'achat (Figure 14).

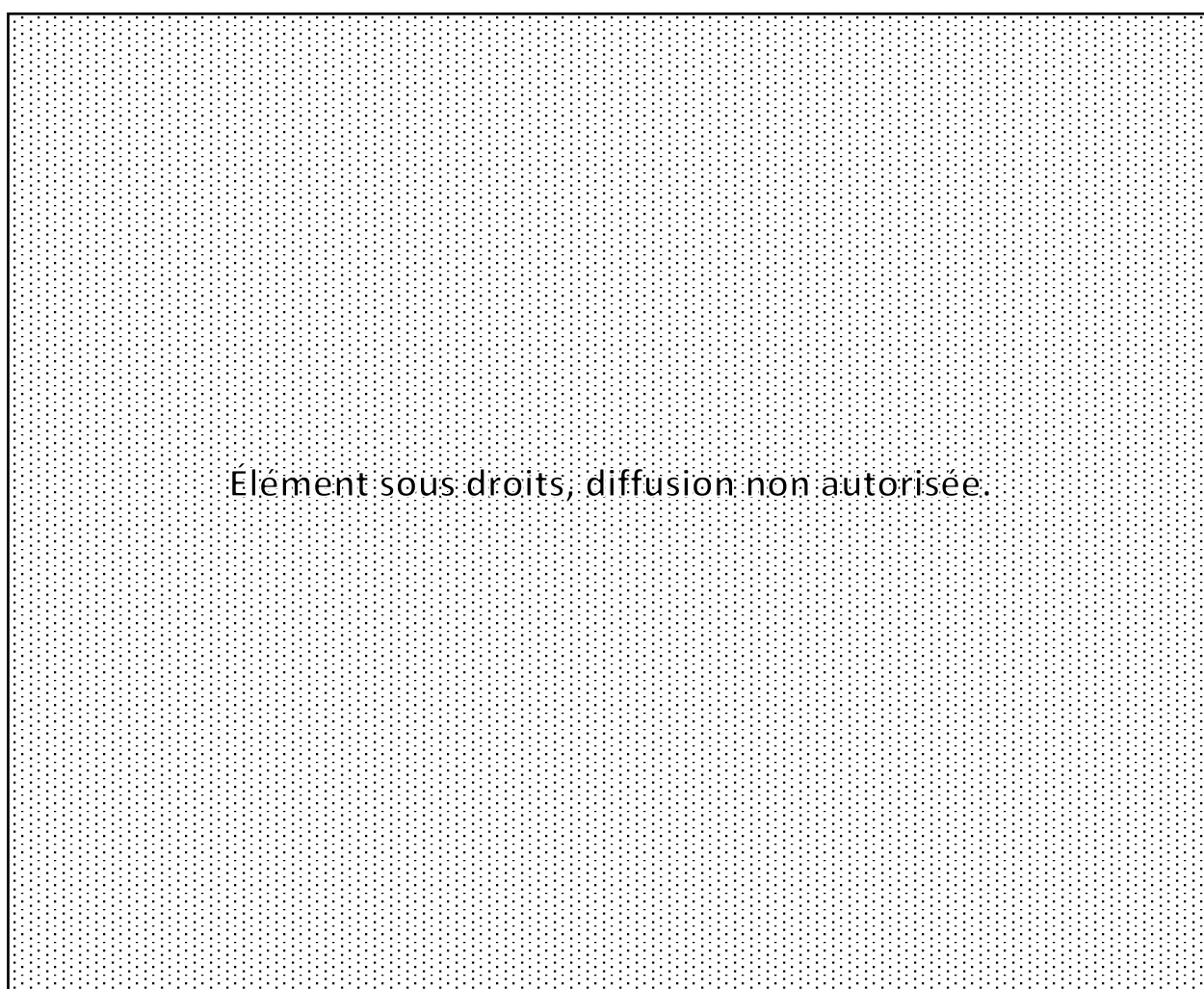


Figure 14 : Tableau de Yerushalmy et al., colligeant les acteurs institutionnels qui disposent de bactériophages disponibles à l'achat (69).

Mais, en Union européenne, le recours à ces acteurs institutionnels n'est autorisé qu'à des fins de recherche puisqu'aucun de ces sites ne dispose d'autorisation de mise sur le marché.

Il existe ensuite des acteurs institutionnels qui proposent un accès non seulement aux bactériophages mais aussi à la prise en charge de patients par phagothérapie, parmi lesquels:

- Une équipe dédiée de l'hôpital militaire de la Reine Astrid à Bruxelles a sélectionné et purifié, selon la Monographie établie par leur équipe, des bactériophages actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *S. aureus*. L'équipe avait, en 2019, traité 15 patients européens (70).
- L'Institut Eliava, qui, en plus produire des solutions de bactériophages prêtes à l'emploi, dispose d'un centre de recherche qui élabore à la demande des préparations de bactériophages adaptées aux patients en situation d'impasse thérapeutique (71).
- L'Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale Hirsfeld, en Pologne, qui dispose d'une banque de bactériophages et d'un centre de traitement pour les patients atteints d'infections chroniques (72) .

Néanmoins, très peu de patients accèdent à ces structures.

Des solutions de bactériophages sont commercialisées dans les domaines de l'agro-alimentaire, de l'élevage et de l'agriculture par des entreprises dont une liste non exhaustive est donnée Tableau 1.

Tableau 1 : Entreprises commercialisant des solutions antibactériennes contenant des bactériophages destinés à un usage agro-alimentaire et d'élevage.

Entreprise	Bactéries-cibles	Usage
Vetophage	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>E. coli</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>S. pseudintermedius</i>	Vétérinaire
OmniLytics	<i>E. coli</i> <i>Listeria</i> <i>Salmonella</i>	Agricole
BioTector	<i>Salmonella</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i>	Elevage
Intralytix	<i>Listeria</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigella spp</i> <i>E. coli</i> O157:H7	Agro-alimentaire et médical
PhageGuard	<i>E. coli</i> <i>Listeria</i> <i>Salmonella</i>	Agro-alimentaire
Micromir	non précisées	Médical et vétérinaire

Des solutions de bactériophages à usage humain sont disponibles dans les pays de l'Est: des firmes pharmaceutiques russes (Micromir, Microgen) et le centre de production de l'Institut Eliava en Géorgie produisent des cocktails pouvant contenir des dizaines de bactériophages (73) pour des indications thérapeutiques d'infections ORL, cutanées, digestives... Ces solutions, qui ciblent généralement plusieurs espèces bactériennes, sont disponibles en pharmacie et en usage libre. En l'absence d'autorisation d'utilisation chez l'Homme, et

conformément à la réglementation des produits de santé, leur importation en Union Européenne est interdite.

Un espoir réside dans le nombre croissant de start-ups qui effectuent des recherches sur les bactériophages avec comme objectif le développement de la phagothérapie chez l'Homme. Certaines, listées de façon non exhaustive dans le Tableau 2, ont pour but l'obtention de l'autorisation européenne de mise sur le marché (AMM) et ont engagé des essais cliniques de phases I/II.

Tableau 2 : Start-ups produisant des bactériophages disponibles à l'achat.

Entreprise	Bactéries-cibles	Usage	BPF
Creative Biolabs	En théorie toutes les bactéries cultivables	Recherche	oui
Pherecydes Pharma	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Médical	En cours
Adaptive phage Therapeutics	nombreuses espèces	Médical et recherche biomédicale	oui ?
Armata Pharmaceuticals	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> et autres en développement	Médical et recherche biomédicale	oui
Biomx	<i>Cutibacterium acnes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Médical et recherche biomédicale	oui

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE :

Les objectifs de mon travail de thèse s'inscrivent dans l'optique d'un redéploiement de la phagothérapie. Il s'agit d'une part de dresser un état de lieux de l'aspect juridique de l'utilisation des bactériophages en médecine et d'autre part de développer un modèle de pharmacométrie pour permettre à terme de mieux encadrer les modalités d'administration des bactériophages.

Ma participation à la rédaction d'un Guide (disponible en Annexe III) m'a amenée à réfléchir sur les cadres réglementaires dans lesquels les différents intervenants, médecins, pharmaciens et développeurs peuvent administrer des bactériophages. Parallèlement, ce travail invite à interroger la place de la phagothérapie dans la réglementation existante.

L'étude de la pharmacométrie des bactériophages s'est développée autour de deux axes complémentaires. L'un est basé sur une revue de la littérature et l'autre sur un travail expérimental couplé au développement d'un modèle mathématique. Conjointement, ces travaux fournissent des données robustes concernant la pharmacocinétique (PK), la pharmacodynamie (PD) et un modèle PK/PD en phagothérapie, qui, *in fine*, permettront de déterminer la dose et la voie d'administration la plus adéquate à chaque situation clinique. Ces travaux seront utiles non seulement aux pharmaciens et médecins qui aujourd'hui déjà administrent des bactériophages mais aussi aux investigateurs de futurs essais cliniques.

II. RÉSULTATS

A. Trouver le cadre réglementaire :

En France le droit qui s'applique aux médicaments est exprimé dans des textes européens et des textes français. L'objet des textes européens est principalement de réglementer les médicaments ayant le statut de « spécialités pharmaceutiques » et toutes les étapes préalables à leur autorisation de mise sur le marché (AMM) ainsi que toutes les étapes dites « post AMM », notamment les actions de pharmacovigilance et de plan de gestion des risques.

Ces textes européens sont :

- La Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Cette directive est considérée comme valant « code européen du médicament », ou plutôt comme « code européen de la spécialité pharmaceutique ». En effet, elle ne régit que les médicaments destinés à être commercialisés après octroi d'une AMM, et qui répondent donc à la définition des spécialités pharmaceutiques, à savoir des médicaments préparés à l'avance, présentés sous un conditionnement particulier et caractérisés par une dénomination spéciale.

- Le Règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 élargissant les procédures communautaires d'autorisation et de surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une Agence européenne des médicaments.

Les textes français sur les médicaments comportent, à côté des dispositions qui transposent les textes européens, des dispositions propres aux médicaments qui n'ont pas le statut de spécialité pharmaceutique, telles que les préparations magistrales. Ces textes sont regroupés dans le Code de la Santé Publique (CSP).

Parmi ces textes européens ou français, il faut mentionner deux documents techniques qui concernent plus directement notre sujet :

- Le guide des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) annexé à la Décision de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) du 29 décembre 2015 (modifiée depuis), qui est une traduction *ad integrum* du guide européen,
- La Pharmacopée française (CSP article L5112-1 : La pharmacopée française comprend les textes de la pharmacopée européenne et ceux de la pharmacopée française).

Tel est le cadre juridique dans lequel la phagothérapie doit s'inscrire. La détermination de celles des règles juridiques applicables précisément à la phagothérapie passe par la qualification juridique des bactériophages. Dans un deuxième temps les textes applicables à la production de bactériophages et à leurs utilisations seront identifiés.

1 La qualification juridique des bactériophages

1.a *Les bactériophages sont des médicaments*

Le CSP et les textes européens ont une même définition du médicament. Le CSP définit le médicament comme suit :

Article L5111-1 (premier alinéa) : *On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.*

La qualification de médicament a été reconnue aux bactériophages par L'Agence européenne des médicaments (EMA) en 2015. Aussi, lors de la réunion du comité scientifique spécialisé temporaire (CSST) sur la phagothérapie organisée par l'ANSM le 24 mars 2016, il a été acté que « les bactériophages relèvent de la réglementation applicable aux médicaments ».

Les textes juridiques ont créé, au sein des médicaments, des catégories particulières soumises, sur certains points, à des dispositions particulières. Parmi ces catégories figure celle des médicaments biologiques. Les bactériophages relèvent-ils de cette catégorie ?

1.b Les bactériophages sont des médicaments biologiques.

Le règlement (CE) n° 726/200 renvoie pour les définitions à la Directive 2001/83. Le médicament biologique y est défini en son Annexe I :

Annexe I – Partie I, module 3, 3-2-1-1– b) : Un médicament biologique est un produit dont la substance active est une substance biologique. Une substance biologique est une substance qui est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle.

Cette définition se poursuit en citant des exemples de médicaments biologiques :

Sont considérés comme médicaments biologiques les médicaments immunologiques et les médicaments dérivés du sang et du plasma humains, les médicaments dits de biotechnologie (définis dans la partie A de l'annexe du règlement (CEE) no 2309/93) et les médicaments de thérapie innovante définis dans la partie IV de la présente annexe.

L'alinéa 14° de l'article du L.5121-1 du CSP français reprend mot pour mot la définition générale de la Directive. Donc, au plan de la définition réglementaire, qu'elle soit européenne ou française, les bactériophages, en tant que substance active d'un médicament doivent être considérés comme une substance active biologique. La même remarque vaut pour les médicaments microbiotiques compte tenu de l'origine biologique de la substance active.

2. Dans quel cadre juridique administrer des bactériophages à un patient ?

Nous avons vu que les bactériophages sont considérés comme des médicaments. Il faut maintenant étudier le cadre réglementaire qui pourrait s'appliquer à la phagothérapie. En effet, comme énoncé plus haut, deux voies sont ouvertes pour l'utilisation en thérapeutique de « médicament » : d'une part l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour les bactériophages préparés sous forme de spécialités pharmaceutiques, et d'autre part le statut de préparations (magistrales, officinales ou hospitalières) qui peuvent être réalisées par des pharmaciens, sur la base de prescriptions médicales nominatives.

2.a En vue d'une commercialisation, une étape indispensable : l'autorisation de mise sur le marché (AMM)

Les médicaments, pour être commercialisés comme « spécialités pharmaceutiques », doivent disposer d'une AMM. Cette AMM est accordée après examen d'un dossier qui doit comporter notamment en application de l'annexe 1 de la Directive 2001/83/CE, trois modules pour évaluer la qualité (module 3), la sécurité d'emploi (module 4) et l'efficacité et la tolérance (module 5) :

- Module 3 : qualité pharmaceutique (mode de fabrication/production du principe actif, mode de fabrication du produit fini [le principe actif et ses excipients pour former le médicament sous sa forme de délivrance], méthodes de contrôles du médicament avant libération, données de stabilité du médicament pour justifier des conditions de stockage et durée de conservation, etc..). Ce module peut être rédigé à partir d'une Monographie préexistante publiée dans la Pharmacopée Européenne ou bien être produite *de novo* par le développeur.

- Module 4 : données pharmaco-toxicologiques pour établir le profil de sécurité et tolérance du principe actif, sur des modèles d'études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal.

- Module 5 : données cliniques pour établir, au travers des essais cliniques organisés en trois phases progressives (Phase I, II puis III), le profil de tolérance et d'efficacité (évaluation de l'effet clinique en fonction de la dose) du candidat médicament.

S'agissant des données sur la qualité chimique, biologique ou microbiologique du médicament (substance active et produit fini) (module 3), on soulignera le point (5) de l'Introduction de l'Annexe 1 de la Directive 2001/83/CE qui précise :

Concernant la partie qualité (chimique, pharmaceutique et biologique) du dossier, toutes les monographies, y compris les monographies générales, et les chapitres généraux de la Pharmacopée européenne sont applicables.

Le développeur pourra donc s'appuyer sur une telle monographie si elle existe. Or l'existence d'une monographie facilite l'examen, par le Comité des médicaments à usage humain (CHMP) de l'Agence Européenne des médicaments (EMA), du médicament soumis à la procédure d'AMM. En son absence, ce sera au développeur de produire et justifier le processus assurant la qualité du médicament. Dans le cas des bactériophages, actuellement ni la Pharmacopée française ni la Pharmacopée européenne ne contiennent de monographie relative aux bactériophages. Cependant la rédaction d'une monographie relative aux bactériophages est en cours. Il s'agit du projet belge intitulé « Phage active pharmaceutical ingredients » sur lequel il sera revenu plus loin.

En ce qui concerne la mise en œuvre des procédés de fabrication et de leurs contrôles (dont le développement et la validation auront fait l'objet d'une documentation détaillée dans le module 3 du dossier d'AMM), le Point (6) de l'Introduction de l'Annexe 1 de la Directive 2001/83/CE précise :

Le processus de fabrication est conforme aux exigences de la directive 91/356/CEE de la Commission établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication pour les médicaments à usage humain et aux principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication, publiés par la Commission dans La réglementation des médicaments dans la Communauté européenne, volume 4.

Ou encore, dans l'introduction du guide des BPF de l'ANSM qui reprend les dispositions européennes :

Les principes de BPF et les lignes directrices particulières s'appliquent à toutes les opérations requérant les autorisations prévues aux articles 40 de la directive 2001/83/CE et 13 de la directive 2001/20/CE, tels qu'amendés.

S'agissant de l'application des BPF pour la fabrication en routine du médicament lorsqu'il aura obtenu son AMM, le fabricant (un établissement autorisé à fabriquer des médicaments à usage humain) devra prendre en compte l'ensemble des principes d'assurance qualité contenus dans le guide des BPF, dont l'annexe 2 spécialement développée pour les productions de médicaments biologiques ainsi que certains des procédés décrits dans le chapitre 18 intitulé *Dispositions spécifiques pour les substances actives fabriquées par culture cellulaire/fermentation*.

On remarque enfin que l'Annexe 1 de la Directive 2001/83/CE fait état aussi de normes de bonnes pratiques de laboratoire (qu'il faut appliquer pour la réalisation des études de pharmaco-toxicologie sur les modèles animaux) et de bonnes pratiques cliniques (qu'il faut appliquer lors de la réalisation des essais cliniques depuis la phase I jusqu'à la phase III).

En conclusion, si les bactériophages sont de bons candidats au développement de spécialités pharmaceutiques, force est de constater qu'en raison de leurs particularités et de l'absence de réglementation spécifique, les développeurs devront, tout en respectant les règles générales des textes régissant les AMM, proposer leurs procédés, leurs critères et leurs méthodes aux autorités qui, après évaluation fixeront les éventuelles normes à retenir pour ces nouveaux médicaments.

Comme évoqué plus haut, il n'y a pas à ce jour de spécialités pharmaceutiques avec AMM disponibles en Europe. Il existe cependant un dispositif français qui permet d'ores et déjà de traiter par phagothérapie certains patients.

2.b Du mauvais usage du terme « compassionnel »

Certains hôpitaux administrent déjà des bactériophages à leurs patients. Cette pratique est communément présentée comme répondant à un usage « compassionnel ». Toutefois il s'agit d'une appellation inappropriée dans la mesure où le terme d'usage compassionnel est réservé par l'article 83 du Règlement (CE) n° 726/2004 à des médicaments ayant reçu une AMM ou étant en cours d'obtention d'une AMM.

1. Par dérogation à l'article 6 de la directive 2001/83/CE, les États membres peuvent rendre disponible en vue d'un usage compassionnel un médicament à usage humain relevant des catégories visées à l'article 3, paragraphes 1 et 2, du présent règlement.

2. Aux fins du présent article, on entend par "usage compassionnel", la mise à disposition, pour des raisons compassionnelles, d'un médicament relevant des catégories visées à l'article 3, paragraphes 1 et 2, à un groupe de patients souffrant d'une maladie invalidante, chronique ou grave, ou d'une maladie considérée comme mettant la vie en danger, ces patients ne pouvant pas être traités de manière satisfaisante par un médicament autorisé. Le médicament concerné doit soit avoir fait l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché conformément à l'article 6 du présent règlement, soit être en cours d'essais cliniques.

Cette disposition européenne ne pourrait donc être invoquée que s'agissant des solutions de bactériophages répondant à cette condition d'une AMM obtenue ou en cours d'obtention, c'est-à-dire par exemple de celles produites par la firme Pherecydes et utilisées dans l'essai Phagoburn, mais non de celles produites au sein de l'hôpital de la Reine Astrid par exemple.

Le terme « compassionnel » est aussi présent dans le droit français. Les développements suivants valent pour les dispositifs en vigueur depuis le 1^{er} juillet 2021, date d'entrée en vigueur de la Loi n° 2020-1576 du 14 décembre 2020 de financement de la sécurité sociale qui a opéré une refonte du système. Dans la version en vigueur du CSP, c'est l'article L 5121-12-1 du CSP qui donne une définition générale de l'accès compassionnel (paragraphe I) et décrit précisément les dispositifs méritant ce qualificatif (paragraphes II et III).

I. Les articles L. 5121-8 et L. 5121-9-1 ne font pas obstacle à l'utilisation exceptionnelle, au titre de l'accès compassionnel, de certains médicaments, dans des indications thérapeutiques précises, lorsque les conditions suivantes sont réunies :

1° Le médicament ne fait pas l'objet d'une recherche impliquant la personne humaine à des fins commerciales ;

2° Il n'existe pas de traitement approprié ;

3° L'efficacité et la sécurité du médicament sont présumées au regard des données cliniques disponibles ainsi que, lorsque l'indication concerne une maladie rare, des travaux et des

données collectées par les professionnels de santé dans des conditions définies par décret en Conseil d'Etat.

Cette utilisation exceptionnelle s'effectue en application soit d'une autorisation définie au II du présent article, soit d'un cadre de prescription compassionnelle défini au III.

On lit donc que ce que cet article appelle « accès compassionnel » est réservé aux médicaments ne faisant pas l'objet « d'une recherche impliquant la personne humaine à des fins commerciales » (condition 1°). Ce qui exclut d'emblée les bactériophages « spécialités pharmaceutiques » développés par un futur titulaire d'AMM en vue de leur mise sur le marché. On note cependant qu'une exception, dite d'« accès très précoce », est posée à cette condition par le deuxième alinéa du paragraphe II. Elle ne vaut que si le développeur (et futur titulaire d'une AMM) s'engage à déposer dans un certain délai la demande d'accès précoce prévue à l'article L 5121-12 du CSP.

Les possibilités de traiter les patients avec des médicaments, spécialités pharmaceutiques, contenant des bactériophages comme principe actif n'est donc pas possible actuellement, car aucun médicament avec AMM n'est disponible. De même l'option de l'usage compassionnel, comme celle dite de l'accès précoce, doit être écartée puisqu'aucun médicament, spécialité pharmaceutique, n'est actuellement candidat à une prochaine AMM.

Aussi, il convient de rechercher une alternative réglementaire qui, tout en respectant la qualification de « médicament » pour les solutions de bactériophages (puisqu'elles sont utilisées dans le but de traiter une maladie) pourrait faire appel à d'autres bases légales d'autorisation. C'est ce qui a été envisagé, en France, par l'Agence de Sécurité du médicament (ANSM), en ayant recours au statut de préparation magistrale.

2.c Des bactériophages préparés en formules magistrales

À côté des prescriptions possibles de médicaments disposant d'une AMM ou autorisées au titre de l'accès compassionnel ou de l'accès précoce, le CSP permet dans son article L 5121-1, dans certaines circonstances, d'administrer des médicaments sous forme de préparation magistrale, de préparation hospitalière ou de préparation officinale :

1° Préparation magistrale, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé lorsqu'il n'existe pas de spécialité pharmaceutique adaptée ou disponible, y compris du fait de l'absence de commercialisation effective, disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations ou d'un cadre de prescription compassionnelle mentionnés aux articles L. 5121-9-1, L. 5121-12 et L. 5121-12-1, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-6 ;

2° Préparation hospitalière, tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L.5121-5 ...

3° Préparation officinale, tout médicament préparé en pharmacie, inscrit à la pharmacopée ou au formulaire national et destiné à être dispensé directement aux patients approvisionnés par cette pharmacie.

Puisque les bactériophages n'ont pas encore fait l'objet d'une monographie intégrée dans la pharmacopée (française ou européenne), aucune préparation de bactériophages ne pourra être qualifiée de « préparation hospitalière » ou « préparation officinale ». Ainsi, seul le recours au statut de préparation magistrale (1^{er} alinéa) apparaît une option valide pour permettre à un pharmacien de préparer, sur prescription médicale nominative, un médicament contenant comme principe actif une solution de bactériophages.

C'est ce statut exceptionnel et nominatif que l'ANSM a accepté d'encadrer, compte tenu des situations thérapeutiques engageant le pronostic vital ou fonctionnel de patients atteints d'infections récidivantes, chroniques et multirésistantes aux antibiotiques. L'utilisation de ce statut de préparation magistrale suppose une décision et une responsabilité commune entre le médecin prescripteur et le pharmacien en charge de la préparation magistrale.

- Pour le médecin prescripteur, de disposer d'éléments scientifiques probants en termes de sécurité et d'efficacité lui permettant de proposer au patient une telle option thérapeutique,

- Pour le pharmacien qui n'a ni les compétences ni les outils pour la production et le contrôle de la solution de bactériophages, de disposer de toutes les garanties de qualité que devra lui apporter le fournisseur de la solution de bactériophages, avant qu'il ne procède à la mise en forme finale du produit pour permettre l'administration de ce médicament préparé nominativement pour un patient sur prescription médicale.

L'ANSM intervient dans ce processus au travers d'un groupe de travail ayant pour mission de réunir le maximum de données scientifiques disponibles (pharmaceutiques et médicales) pour permettre, au cas par cas, la prise de décision de traitement des patients dont les dossiers médicaux lui sont soumis. Parmi les éléments scientifiques, et constatant l'absence de textes de référence pour décrire une production, de qualité pharmaceutique, de solutions de phages, l'intérêt du groupe de travail s'est porté sur le projet de monographie qu'un groupe de scientifiques Belges de l'hôpital de la Reine Astrid à Bruxelles est en train d'élaborer. Ce projet belge de monographie intitulé « Phage active pharmaceutical ingredients » (74) (Figure 15), accompagné d'un schéma descriptif du procédé de production et des différents contrôles qualité à réaliser tout au long de la fabrication (Figure 16) sert de « référentiel qualité » pour la qualification des différentes sources fournisseur de solutions de phages, telles que présentées en Figure 14.

PHAGE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

DEFINITION

Phage active pharmaceutical ingredients (APIs) are pharmaceutical raw materials containing naturally occurring bacteriophages (phages in short), which are viruses that infect bacteria. Phages are composed of proteins that encapsulate a DNA or RNA genome, and may have relatively simple or elaborate structures. Phages replicate within a bacterium following the injection of their genome into its cytoplasm.

Phage APIs are intended for use as active ingredients of phage magistral preparations for *in vivo* treatment of bacterial infections (phage therapy).

Phage APIs are available as aqueous physiological solutions containing natural lytic phages (e.g., saline or glucose solutions) that may contain a buffer or as dried or freeze-dried powder. As active ingredients of magistral preparations, they are intended to be diluted or reconstituted and/or combined with the necessary excipients, in a hospital pharmacy officina, immediately before use on a named patient basis. Dosage forms may consist of capsules, creams, ointments, liquid preparation for oral use, cutaneous application, inhalation or parenteral administration, etc. The excipients needed to formulate these dosage forms must allow the required phage activity during the intended application period.

Each phage API contains one phage strain and various phage strains APIs may be combined into one magistral preparation to broaden the spectrum of activity of the medicine.

The magistral preparation of phage therapy products is a practical way for medical doctors to personalize antibacterial treatments.

This monograph does not apply to phage derived products such as phage endolysins. It does not necessarily apply to phage products for veterinary use or for decontamination purposes.

In addition to the requirements specified in this general monograph, specific requirements for production, in process testing and release testing might be included in individual monographs.

PRODUCTION

MANUFACTURING PROCESS

Phage APIs are generally obtained by propagation in host bacterial strains and are purified using appropriate methods shown to preserve the biological properties of the phages. Phage APIs are manufactured under conditions designed to minimise microbial contamination and phage degradation.

Purification procedures need to be designed to minimize the content of harmful bacterial or culture medium components (e.g., bacterial endotoxins and animal products).

The manufacturing process must be described in detail (equipment, materials, culture media, additives, culture conditions, purification steps...) in standard operating procedures (SOPs) and must be validated to confirm that the process can reliably output phage APIs of a determined standard.

The following manufacturing process has shown to be suitable for the small-scale production of qualitatively acceptable and safe phage APIs. It is indicative and based on the state of the art and available knowledge from peer reviewed scientific literature.

The manufacturing process comprises various stages.

De novo phage isolation. Natural phages are generally isolated from environmental samples such as sewage and river water or from clinical samples. Usually, the sample, culture medium and phage sensitive host bacteria (typically 10^7 - 10^8 colony forming units (cfu)) are mixed in a sterile container and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 1-3 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the container is further incubated at 4°C for a short period of time (typically for 1 h). Host bacteria are removed using membrane filtration (0.2-0.5 µm) or by centrifugation. Usually, phages are isolated on bacteriophage sensitive bacteria following the 'double agar overlay method'. Phage lysate is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of bacteriophage sensitive host bacteria (typically 10^7 - 10^9 cfu/ml) in a sterile container. This mixture is transferred to a sterile cell culture container with culture medium containing 1-3% agar and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 12-36 h). The resulting plaques ('clear' zones formed in a lawn of bacterial cells due to lysis by phages) with different morphology are transferred to sterile culture media in sterile containers and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 1-3 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the containers are further incubated at 4°C (typically for 1 h). For each container, a dilution series (typically log(0) - log(-8)) is made in sterile containers filled with culture medium. A part from each dilution is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of bacteriophage sensitive host bacteria (typically 10^7 - 10^9 cfu/ml) in a sterile container. This lysate mixture is transferred to cell culture containers with culture medium containing 1-3% agar and incubated (typically at 37°C for 12-36 h). Plates showing 1-10 plaques are visually analysed. Again, all plaques with different morphology are transferred to sterile culture medium in sterile containers and incubated (typically at 37°C for 1-3 h). This complete cycle is repeated until phage lysates with one plaque morphotype, containing one phage clone, are obtained (homogeneous plaques).

If warranted, phages can be incited to evolve in vitro to exhibit broader host range or higher lytic activity under physiological conditions (e.g., temperature and pH).

Phage seed lots. Phage seed lots are usually prepared using a slightly modified double-agar overlay method. If justified, another adequate solidifying agent than agar can be used. Monoclonal phage lysate (typically containing 10^3 - 10^5 plaque forming units (pfu)) is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of phage sensitive host bacteria (typically 10^7 - 10^9 cfu/ml) in a sterile container. This mixture is transferred to a sterile cell culture container with culture medium containing 1-3% agar and incubated (typically at 37°C for 12-36 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the container is further incubated at 4°C (typically for 1 h). The top agar layer is recuperated and transferred to a sterile container. *Alternatively, buffer solution is added to the top agar layer. The cell culture container is shaken (typically for 1-3 h) and the buffer solution is recuperated.* Bacterial cells and cell debris are removed, usually by centrifugation (e.g., 20 min at 6 000g) followed by membrane filtration (0.2-0.5 µm). Phage seed lots can be stored using validated preservation/storage (cooling, cryopreservation, freeze-drying...) methods.

Phage APIs. Phage APIs are prepared in the same way as phage seed lots, but starting from characterised and quality controlled phage seed lots instead of phage lysates. If justified, other agreed manufacturing methods can be used. In addition, bioburden as well as the levels of impurities, including endotoxins (especially for Gram negative host bacteria) are minimized using appropriate methods (e.g.

dedicated filters, affinity columns, tangential flow filtration, cesium chloride banding).

QUALITY SYSTEM AND PRODUCTION ENVIRONMENT

Phage seed lots and phage APIs should be manufactured under a quality system.

The manufacturing of phage APIs from phage seed lots takes place in an environment with specified air quality and cleanliness to minimize the risk of contamination. The effectiveness of these measures is validated and monitored. Where phage APIs are exposed to the environment during processing, without a subsequent microbial inactivation or removal process, an air quality with particle counts and microbial colony counts equivalent to those of Grade A as defined in the current European Guide to Good Manufacturing Practice (GMP), Annex 1 and Directive 2003/94/EC is required with, if the system is not closed, a background environment at least equivalent to GMP Grade B in terms of particles and microbial counts. The biosafety level (BSL) is determined by the host bacteria used in the production processes (e.g., BSL-2 for *Pseudomonas aeruginosa*).

EQUIPMENT AND MATERIALS

All equipment and material are designed and maintained to suit its intended purpose and must minimize any hazard to recipients and staff. All critical equipment and technical devices are identified and qualified, regularly inspected and preventively maintained in accordance with the manufacturers' instructions. Where equipment or materials affect critical processing or storage parameters (e.g., temperature, pressure, particle counts and microbial contamination levels), they must be identified and subjected to appropriate monitoring, alerts, alarms and corrective action, as required, to detect malfunctions and defects and to ensure that the critical parameters are maintained within acceptable limits at all times. All equipment with a critical measuring function is calibrated against a traceable standard if available. Maintenance, servicing, cleaning, disinfection and sanitation of all critical equipment are performed regularly and recorded accordingly.

SOPs detail the specifications for all critical materials and reagents. In particular, specifications for culture media, additives (e.g., solutions) and packaging materials are defined. Where applicable, reagents and materials meet compendial requirements and/or documented specifications and the requirements of Regulation 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices and Regulation 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices. Animal component free culture media and additives should preferably be used. If materials of human or animal origin are used, measures to control endogenous and adventitious agents including transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents should be implemented. Material from TSE-relevant animal species should be subjected to a risk assessment to demonstrate that TSE risk factors have been considered and that the risk has been minimized by applying the principles described in the general text Ph. Eur. 5.2.8 and the Note for Guidance on Minimizing the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products (EMA/410/01). Compliance to these requirements may be demonstrated on production of a TSE Certificate of suitability granted by the EDQM.

Host bacteria used in the manufacturing process are as safe (or least pathogenic) as possible. Non-lysogenic bacterial strains are used, if possible.

TESTS

Various tests can be applied, but validated tests measuring the identity and quantity of phages, bioburden, bacterial endotoxin levels, pH and, where relevant, water content and residual chloroform of phage APIs, performed by a Belgian Approved Laboratory, are mandatory.

HOST BACTERIA

Identification. State of the art clinical microbiology techniques.

PHAGE SEED LOTS

Phage identification. State of the art DNA or RNA sequencing and genome analysis. When reliable *in silico* morphology prediction is not possible, phage morphology should be determined by electron microscopy.

Phage enumeration. The phage enumeration of the phage seed lot should be determined using an appropriate method (e.g. pfu determination, qPCR).

Phage purity. Absence of adventitious agents (e.g., other phages, bacteria, viruses) should be demonstrated using an appropriate method, unless otherwise justified (e.g. virus testing may be omitted if no or only autoclave-sterilized material of human or animal origin is used).

Detection of genetic determinants conferring toxicity, virulence, lysogeny and antibiotic resistance. State of the art DNA or RNA sequencing and genome analysis.

Raw sequencing data must be provided in a broadly accepted format (e.g. FASTQ) to a Belgian Approved Laboratory for review and approval.

PHAGE APIs

All tests are performed under appropriate quality standards (e.g. ISO17025).

Phage identification. The phage strain of a phage API is determined using a validated or qualified phage identification test (e.g. specific PCR, qPCR.).

Quantitative assessment of phages. The potency of the phage API is determined using a validated or qualified assay (e.g. phage-specific qPCR).

Quantitative bioburden determination (EP 2.6.12). The total aerobic microbial count is determined using the official Ph.Eur. method or, where justified and authorised, using a validated alternative method. Phage APIs are required to contain ≤ 10 cfu/100 ml or g.

Bacterial endotoxins (EP 2.6.14). The test for bacterial endotoxins is used to detect and quantify endotoxins of gram-negative bacterial origin using amoebocyte lysate from horseshoe crab (*Limulus polyphemus* or *Tachypleus tridentatus*). The endotoxin concentration in the phage API should remain below the endotoxin threshold specified in the individual monograph. The endotoxin limit depends on the final therapeutic product (magistral preparation) and its route of administration and is stated in the individual monograph according to compendial requirements. *The maximal dose administered by the intended route per hour should not contain sufficient endotoxin to cause a toxic reaction. For instance, as stated in EP 5.1.10, the maximum dose for intravenous injection is 5 Endotoxin Units (EU)/kg/h.*

Potentiometric determination of pH (EP 2.2.3). The pH should conform to the pH specifications set forth in the individual monograph, usually 6.0-8.0 pH.

Water content (EP 2.5.12 or 2.5.32). Dried phage APIs are tested for water content. The maximum water content is 3.0 per cent m/m, unless otherwise stated in specific monograph (e.g. APIs intended for oral lyophilisates).

Impurities. Process-related impurities should be quantified

and qualified. In particular, when chloroform or any other particular reagent is used in the manufacture of the phage API, an appropriate validated procedure is to be employed for the quantification of the residual chloroform/reagent. Appropriate acceptance criteria should be set up such that the amounts of chloroform/reagent intake are consistently below levels that are demonstrated to be safe.

STORAGE

Phage APIs should be stored under the conditions specified in the individual monograph.

SHELF LIFE

Phage quantity using a stability indicative method, bioburden, pH and, where relevant, water content are periodically determined. The shelf life is the time period during which phage quantity, bioburden, pH and, where relevant, water content of the API remain within the limit thresholds specified in the individual monograph.

LABELLING

The label states:

- the identity and quantity of the phages within the API;
- the type of species and strain of host bacteria used as a substrate for the production of the phage API;
- the type of species and strains of bacteria that the phages are able to lyse;
- the storage conditions;
- the production date;
- the expiration date;
- for dried preparations:
 - the name, composition and volume of the reconstituting liquid to be added;
 - the period of time within which the preparation is to be used after reconstitution;
- instructions for reporting serious adverse reactions and/or events;
- instructions how to dispose of unused (expired) bacteriophage products.

SURVEILLANCE

The clinical use of phage API based magistral preparations must be surveyed and reported, including possible adverse events and reactions associated with their use. A centralized reporting system and a register for therapeutic phage applications are warranted.

Figure 15 : Monographie belge présentée à l'European Directorate for the Quality of Medicine and HealthCare (EDQM).

Élément sous droits, diffusion non autorisée.

Figure 16 : Exemple d'un schéma de production et des étapes de contrôle, proposé pour l'obtention d'une solution de phage (BFC1) destinée à l'utilisation clinique.(75)

Pour concrétiser les efforts du groupe de travail visant à structurer la démarche et aider tant les médecins prescripteurs que les pharmaciens préparant le médicament prêt pour l'administration selon la voie d'administration prescrite, l'idée de la rédaction d'un document formalisant les étapes à suivre en cas de recours à la phagothérapie s'est imposée. C'est pourquoi, en collaboration avec A. Monribot, Nicolas Dufour, Camille d'Humieres, Nathalie Pons-Kerjean, et Julie Bataille, nous avons entrepris la rédaction d'un « Guide d'utilisation des bactériophages ». Ce guide, qui reprend d'abord des informations essentielles à la compréhension de la phagothérapie, fait ensuite état des possibilités d'accès aux bactériophages en France, des indications cliniques retenues, et du cheminement réglementaire à suivre pour pouvoir les prescrire, les faire préparer par la pharmacie hospitalière et les administrer aux patients. Le guide, disponible en Annexe III, a été validé par l'ANSM et est publié sur le site du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament.

B. Trouver la juste dose

Jusqu'à présent, les protocoles d'administration de bactériophages sont empiriques ou reposent sur des principes théoriques sans vérification clinique.

Afin que des protocoles plus aboutis puissent être proposés, j'ai développé au cours de ma thèse une approche méthodique de la pharmacométrie des bactériophages en étudiant la pharmacocinétique (PK) dans la section B-1 et la modélisation PK/PD dans la section B-2.

1. Pharmacocinétique en phagothérapie : une revue analytique de la littérature

La PK est l'étude quantitative du devenir d'un médicament dans un organisme animal ou humain. Aucune étude complète de la PK des bactériophages n'a été menée à ce jour mais de nombreuses données éparses de PK sont disponibles dans la littérature et accompagnent des études d'efficacité ou de tolérance chez l'animal. Dans le but de synthétiser les connaissances sur la PK des bactériophages, j'ai, avec E. Ruffier, pharmacienne, collecté et analysé les données disponibles dans la littérature sous la forme d'une revue. Comme nous allons le voir, il n'y a rien de comparable entre la PK des antibiotiques ou des médicaments classiques et celle des bactériophages. Le comportement des bactériophages est plutôt à rapprocher de celui des nanoparticules.

Title: PHARMACOKINETICS IN PHAGE THERAPY: A LITERATURE REVIEW AND ANALYSIS.

Authors: R. Delattre^{1,2,3}, E. Ruffier⁴, N. Dufour⁵, J-D. Ricard^{2,6}, L. Debarbieux³

Affiliations:

1 : Centre Hospitalier Digne les Bains, F-04000, France

2 : Université de Paris, INSERM, IAME, Paris F-75006, France

3 : Institut Pasteur, Bacteriophage, Bacterium, Host Laboratory, Paris F-75015 France

4 : Université de Pharmacie, Strasbourg F-67000, France

5 : Centre Hospitalier René Dubos, Cergy Pontoise F-95503, France

6 : APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France.

Summary

Bacteriophages (phages) are viruses infecting bacteria. Their use to treat bacterial infections, phage therapy, has been proposed before the discovery of antibiotics. Nevertheless, phage therapy was abandoned for antibiotics because of ease of use, production facilities and initial great efficacy of antibiotics.

The current situation of difficult to treat infections caused by multi-drug resistant bacteria has changed the perception of phage therapy. From a disregarded treatment available in only few places, phage therapy makes its comeback into medicine, supported by successful case reports around the world (Aslam et al. 2020; Dedrick et al. 2019; Hoyle et al. 2018; Cano et al. 2021; Zhvania et al. 2017; Schooley et al. 2017). However, the lack of large-scale clinical data of double blind clinical trials hinders upscaling phage therapy. Beforehand, the lack of indications on the route of administration and the dose represents also a hurdle to clinical trials design.

With a view of future large prospective studies, we aimed, in this review, to identify from the literature the experimental data related to phage pharmacokinetics (PK) in order to highlight the specific behavior of phages in uninfected and infected animals. Amongst hundreds of articles reporting PK data on phages, only a handful of them were exploitable. The analysis of these data led us to summarize the behavior of phages inside an animal body. Despite converging observations these data are insufficient to propose with confidence therapeutic schemes regarding the administration route and the dose, which however, could be compensated to some extent by recently developed mathematical models.

Introduction

In 1917 F. d'Hérelle proposed to call bacteriophage (phage) the antibacterial agent he isolated from the feces of patients (d'Hérelle 1917). Later recognized as viruses infecting bacteria, phages were used to treat bacterial infections in human and animals shortly after 1917 d'Hérelle's report (Dublanche Alain 2017). Phage therapy has been then used for about a decade before antibiotics discovery (Aminov 2010). Despite being proposed earlier, phage therapy was rapidly abandoned in favor of antibiotics, which have been largely used beyond human medicine. Unfortunately, this massive use resulted in selection of multi-drug resistant (MDR) bacteria that are nowadays a major threat for human health. Facing the challenge of treating infections with no more effective drugs, clinicians are now rethinking phages as an antibiotics alternative (Deak et al. 2016; D. M. Lin, Koskella, and Lin 2017). Recent publications of several successful clinical cases support further the reintroduction of phage therapy in human medicine (Aslam et al. 2020; Dedrick et al. 2019; Hoyle et al. 2018; Cano et al. 2021; Zhvania et al. 2017; Schooley et al. 2017; Zaldastanishvili et al. 2021; Ferry et al. 2020; Terwilliger et al. 2021).

Nonetheless, lack of data in Pharmacokinetics (PK) of phages is a major brake to its expansion. PK is the study of movement of a drug during their passage into a body, from absorption to elimination. It determines guidelines on dose and frequency of drug administration. Whereas PK is an indispensable prerequisite to any drug development in light of marketing authorization, few data are available in literature about phages PK. So far, semi-empiric use of phage-therapy keeps clinicians from an optimum design of clinical trials or compassionate use.

Moreover, phages, like any virus, infect and lyse bacteria to release new progenies that infect bacteria in proximity, which gives to phages the most unique characteristic over any drugs: their dose increases over time. However, to take advantage of this pharmacodynamic (PD) characteristic, phages should reach the site of infection where the pathogen's load must be controlled before its elimination. This step falls under the scope of PK studies. Together, PK/PD data recapitulate the information required to determine the best regimens to reach maximum efficacy of a treatment.

However, since phages are the most abundant biological entity on Earth and display a very large diversity in genome content, it seems unrealistic to engage into PK studies for every single phage. Therefore, to appreciate the similarities and divergences of PK data obtained from independent experiments and attempt to highlight general properties of phages, we searched relevant data in the literature over several decades. Very few dedicated PK studies were reported. However, some experimental phage therapy reports included some PK and/or PD data that were not identified via searches using keywords. We then initiated a larger search using the generic keyword “phage therapy” and from the ~8,500 articles selected, we reviewed the data related to phage PK and or PD. The large diversity of phages and phage-therapy modalities hindered a quantitative meta-analysis. Instead, we focused on a mathematical analysis of each relevant study to provide a qualitative meta-analysis, which will help framing further pre-clinical studies or clinical trials as well as reduce the use of animals.

METHODS

Data collection

Literature was screened in PubMed until April 2020 using the keywords “pharmacokinetics” and “phage”, which led to identify 604 articles. An independent search using the keyword “phage therapy” identified 4126 articles.

The abstracts were read, and articles were selected based on the following criteria: mention of pharmacokinetics data, study in mammals, articles in English or French. Furthermore, we selected only the studies that employed phages belonging to the *Caudovirales* order or unknown phages that were reported for treating a bacterial infection. The articles related to cancerology or other non-infectious diseases were excluded. Additionally, some articles not referenced in PubMed but cited in selected articles from the search were included in the analysis if they corresponded to the above criteria.

Pharmacokinetics data (number-based values or values reported in graphics) were extracted from the articles, reported and analyzed. These data correspond to the concentration of phages in homogenized organs, or blood or feces. As the number of phage particles cannot be directly measured, scientists relied on the ability of phages to form visible plaques on a layer of indicative bacteria to count Plaque Forming Units (PFU). Therefore, only phages able to form plaques are counted.

Generally, PK studies are based on a follow-up of individuals with several data acquired over time. For small animals like mice, ideal approach is the indirect quantification of drug using imaging devices, which implies the drug tagging with a radioactive or fluorescent or other element. However, we found very few longitudinal PK studies of animals after a phage administration. In fact, indirect quantification of phages in organs using imaging devices is a difficult approach notably due to significant changes in size and charge of tagged bacteriophages, leading to “artificial” considerable PK modifications (Prasuhn et al. 2008; Farkas et al. 2013, 2). Generally, animals were sacrificed at pre-determined time-points to provide a single value of phage concentration at this time-point. Consequently, collected data in a study correspond to average phage concentration from different animals. Nevertheless, we found two studies with longitudinal data which were separately analyzed.

BACTERIOPHAGES : A TRULY DIVERSE CLASS OF NANOPARTICLES

Phages represent the most abundant and diverse group of viruses on Earth, with an estimated number of 10^{30} particles (Wommack and Colwell 2000). Not only the nature of their genetic material differs (RNA or DNA, simple or double-strand), but also their morphology.

In this review, we focused on the viral order of *Caudovirales* which includes *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* families, first defined by their morphological characteristics (Figure 1).

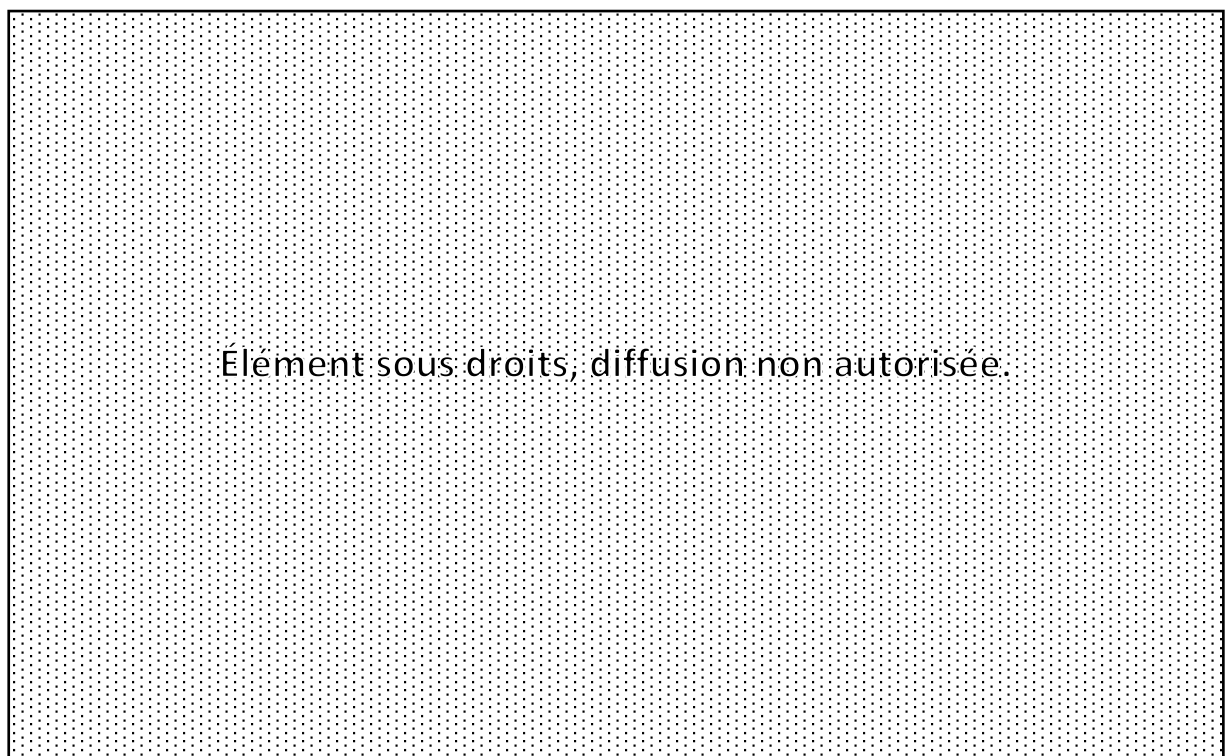


Figure 1: Representative morphologies of different phage families. *Caudovirales*, which include *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* families (on the left) are the longest and largest phage particles. From (Hyman and Abedon 2012).

However, within this Order there is still a considerable diversity of morphologies. In particular, the size of the head, which contains the nucleic acid, are typically 45–170 nm in diameter. The length of the tails, which constitutes the appendage used to recognize the bacterial receptor, are even more variable with size ranging from 3 to 825 nm long ("ICTV 9th Report (2011)," n.d.). Consequently, length and shape of phages are highly variable.

With the advent of high throughput sequencing the taxonomy of viruses is now based on genomic information. Nevertheless, genetic proximity does not guarantee similar morphology (Turner, Kropinski, and Adriaenssens 2021).

In the field of antibacterial agents, phages are far larger than antibiotics, preventing the direct use of PK models developed for those small molecules. With this respect, we investigated the possibility to assimilate phages to nanoparticles to appreciate their PK.

A. Nanoparticles and PK

Use of nanoparticles (generally defined by a size above 10 nm) in medicine has recently expanded in many fields and particularly in oncology and medical imaging. Their size is generally the consequence of the assemblage of a pharmacologically-active molecule with a molecule providing a selective targeting to specific tissues. Studies on nanoparticles have shown that they do not follow distribution and elimination pathways observed for smaller drugs. Nanoparticles journey inside a body is generally characterized by a short half-life, unless the nanoparticles are coated or shaped (Ernsting et al. 2013). Moreover, the pharmacokinetics of nanoparticles is highly influenced by their size and electrical charge.

a. Size and shape

Pharmacokinetics studies of nanoparticles have shown that both their size and shape (spherical, ellipsoidal, filamentous) influence their half-life (Figure 2) (Hoshyar et al. 2016).



Figure 2: Half-life of nanoparticles in animal models according to their diameter. From (Hoshyar et al. 2016).

b. Electric charge

Another major determinant of nanoparticles PK is the electric charge (Blot, Pea, and Lipman 2014). Generally measured as zeta potential, the electric charge has been shown to impact biodistribution of different nanoparticles. It could influence the interaction with proteins in serum and the uptake by immune cells. In phages, electric charges are mainly determined by the abundance of the five charged amino-acids in structural proteins and their position along the assembled particle. Composition and repartition of charged residues is highly variable from one phage to another so is the zeta potential (Michen and Graule 2010).

Thus, considering factors influencing nanoparticles PK, it is obvious that phages PK should not be seen as a unique entity but, instead, as a multiplicity of situations. Moreover, some factors as electric charge, *in silico* difficult to predict, prevent us to adjust a common rule based on physico-chemical characteristics of phages.

However, in this work, we aimed to outline a possible common biofate for phages despite their diversity.

B. PK study on phages : how can we proceed ?

Classical approach to characterize PK is to follow individuals (animals or humans) with data at different time-points to have a longitudinal view of the dissemination of the drug. In small animals like mice, repeated samples are uneasy. A way to circumvent this issue is to use imaging devices and modified phages for carrying a specific signal. This was performed with MS2 phage(Farkas et al. 2013), which belongs to the order of *Norzivirales*. This phage is notably much smaller than any *Caudovirales* phage and in this study it was considerably modified by emptying its genome and replacing it by labeled tetraxetan chelators.

In the subsequent analysis of the data extracted from the selected publications, results come from organs of sacrificed animals or blood samples. Unfortunately, no longitudinal follow-up of animals was available and each data represents the mean of individual points. Below, we report our analysis of the PK data in healthy animals to evaluate the PK profile of phages, followed by the data from infected animals.

II. PHAGES PK IN HEALTHY ANIMAL

A. IV administration:

From the animals that received an IV administration of phages we could estimate the apparent distribution volume (V_d) and the half-life of phages. The V_d is the theoretical volume of liquid in which all the administered drug should be diluted to obtain a given plasma concentration (“Revue Générale de La Pharmacocinétique - Pharmacologie Clinique - Édition Professionnelle Du Manuel MSD” n.d.). It can be calculated in a mono compartmental approach by $V_d = \text{Dose}/C_0$ (theoretical concentration at $t=0$, obtained by extrapolation). The half-life is the elapsed time to observe a decrease of 50% of the plasmatic concentrations of phages.

We selected studies that included at least three time-points and at least one time-point within the first two hours following phage IV administration. A total of seven experiments reported in six publications were analyzed and grouped by animal species (Table 1) (Cervený et al. 2002; Oechslin et al. 2017; Inchley 1969; Sarhan R Sarhan 2017; Sulkin, Finkelstein, and Rosenblum 1957; Międzybrodzki et al. 2017).

From the data collected we performed non linear regressions in both one and two phase decay. One-phase decays showed systematically a better fit from which we obtained values of C_0 that were used to calculate V_d (Figure 3 and Table 1).

Phages concentration in blood peaked at the first time of sampling following administration and then decreased following a one-step decay slope in all the studies. Despite the variations in the frequency of time points, in the median values from different number of animals (without estimation of the dispersion) and in the limit of detection, we performed a non-linear regression to obtain half-life and distribution volume according to animal species (mice, rats and rabbits) (Figure 3).

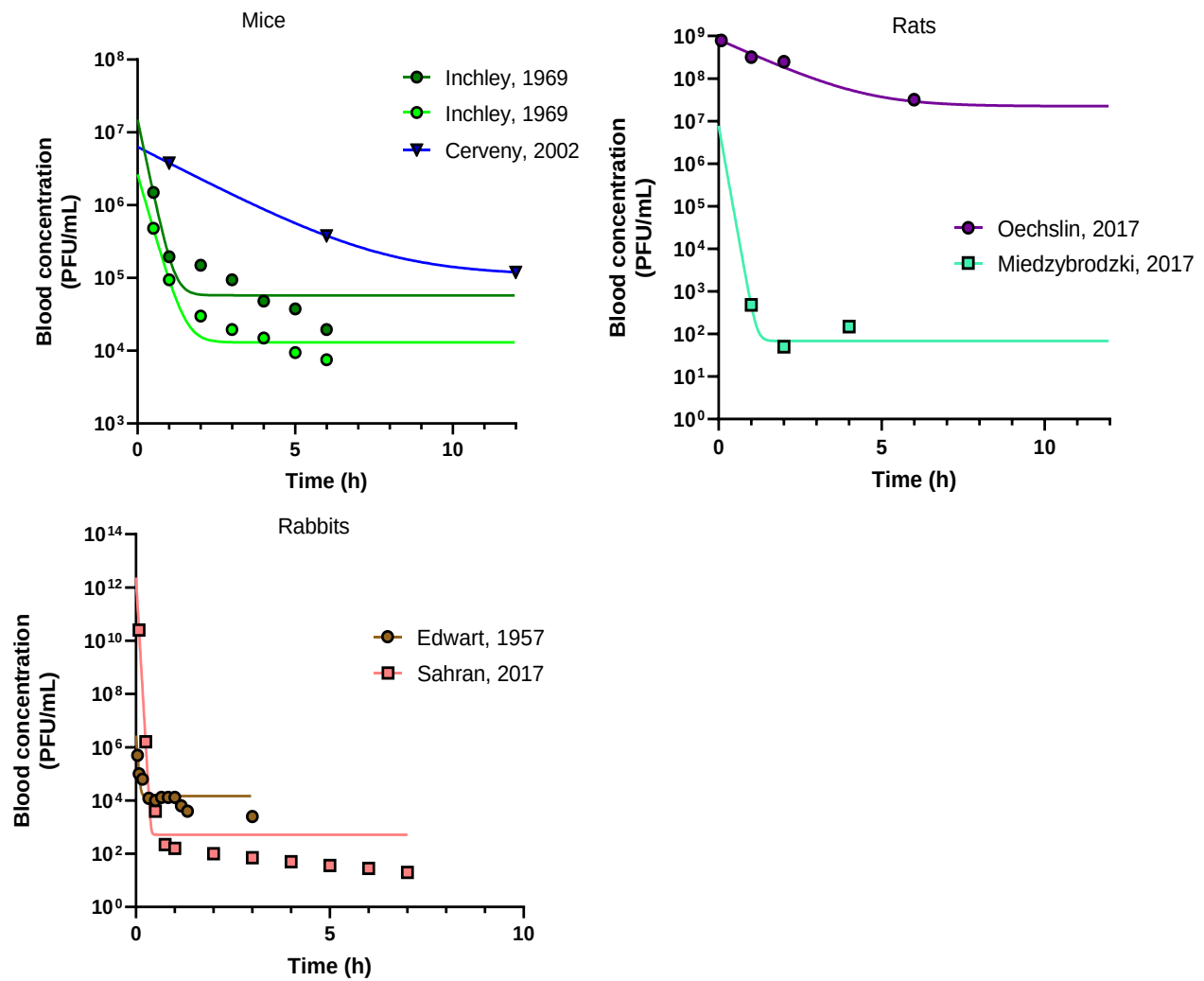


Figure 3: Blood concentrations of phages over time following their IV administration and the associated non-linear regression curves.

From non-linear regression, we deduced half-life and distribution volume of these studies.

Table 1: Estimated half-lives and distribution volumes (Vd) after IV administration of phages.

NA : non available because of an unstable parameter in the regression keeping from obtaining a precise value of C0.

Author, Year	Animal	Phage	Administered dose (PFU)	Estimated C0 (PFU/mL)	Estimated Vd (administered dose/C0) (mL)	Estimated Half-life (h)
Inchley, 1969	mice	T4	5,0E+08	1,5E+07	3,4E+01	0,15
Inchley, 1969	mice	T4	5,0E+08	2,6E+06	1,9E+02	0,20
Cerveny, 2002	mice	153A5	1,0E+08	6,3E+06	1,6E+01	1,33
Oechslin, 2017	rats	PP1131 cocktail	1,0E+10	NA	NA	0,87
Miedzybrodzki, 2017	rats	A 5/80	2,0E+09	NA	NA	0,07
Edward, 1957	rabbits	Not described	1,0E+09	2,8E+06	3,6E+02	0,02
Sarhan, 2017	rabbits	Not described	Not described	NA	NA	0,01

1. Half-lives :

As anticipated from nanoparticles PK, the half-lives of phages in the blood of animals are around minutes for five studies and about one hour for two others. As the study of by Oechslin was performed with a cocktail of 13 phages it remains possible that some of them display a longer half-life than others supporting the overall long half-life. From the study by Cerveny we calculated an half-life of 1.3 h whereas the authors calculated it at 2.2h but without explanation on the method they used. Moreover, there is no detailed information (no microscopy and no genome) about the phage 153A-5, infecting *Vibrio vulnificus*, preventing any further hypothesis to explain this large half-life.

By comparison, the half-life of Amoxicillin is one hour in humans and 21 min in mice (Andes and Craig 1998). The relatively short half-life for phages is not surprising *per se*, considering available data about large nanoparticles, but directly question whether IV administration will allow enough phages to reach the target organ. It also raises the question about the mechanisms involved in the elimination of phages from the blood.

2. VD:

We noticed that the shortest half-lives were obtained from experiments performed in rabbits, which could be explained by a larger Vd value. Within the same animal species (mouse and rat) we also noticed a large variability among half-lives and Vd values. This may not be of concern considering the variability observed in the PK studies of nanoparticles.

Vd values were also dispersed but systematically higher than blood volume, testifying the dispersion of phages out of the bloodstream short after their administration, or their very fast inactivation. Phages Vd was higher than for small enveloped PEG-nanoparticles (Cho et al. 2009) or curcumin-loaded PEG nanoparticles (Feng, Song, and Zhai 2012) but lower than silica nanoparticles, whose Vd was obtained at steady state in a two compartmental model (Yu et al. 2012).

It must also be noted that the study of Sarhan reported an initial concentration of phages in the blood of rabbits, which when reported to the volume of blood in rabbits, revealed a dose that was higher than the administered dose, suggesting a typo error in one of the two values.

Another study, which did not fulfill the above inclusion criteria, showed that a modification of a basic amino-acid for an acidic one (lysine to glutamic acid) in the major capsid protein of phage lambda increased by several order of magnitude the half-life of this phage in mice (Merril et al. 1996). This work suggests, such as for nanoparticles, that the electric charge of phages is a major factor that can influence the biofate of phages in bloodstream.

Next, we analyzed the biofate of phages following IP administration, which is frequently used in murine models of phage therapy.

B. IP administration:

We found numerous studies harboring PK data following IP administration of phages in healthy mice (Heo et al. 2009; Singla et al. 2016; Dabrowska et al. 2007; T.-L. Lin et al. 2014; Vitiello, Merrill, and Adhya 2005; Nishikawa et al. 2008; Malick and Chibber 2009; Uchiyama et al. 2009; Serwer, Wright, and Lee 2019; Aleshkin et al. 2016; Hodyra-Stefaniak et al. 2015;

Jun et al. 2014; Keller and Engley 1958a; Geier, Trigg, and Merrill 1973; Tiwari et al. 2011; McVay, Velásquez, and Fralick 2007; Dubos, Straus, and Pierce 1943). Another study was performed in rat pups (Pouillot et al. 2012). After an IP administration small molecules and nanoparticles are known to reach rapidly bloodstream. Therefore, IP is often regarded as an IV administration and is then more frequently practiced in small animals (mouse) compared to IV administration. The data indeed revealed a rapid passage of phages from peritoneal cavity to bloodstream with a maximal concentration of phages in blood observed at the first time-points (from 30 min to 48h post administration, according to experimental scheme).

Quite disappointing was the observation that only three of these studies included data with early time-points (before 3 hours post administration) that did fit with the non-linear regression decay. (Table 2 and Figure4), probably indicating that IP administration differs from IV route. In fact, it remained unclear how phages would reach bloodstream following IP administration.

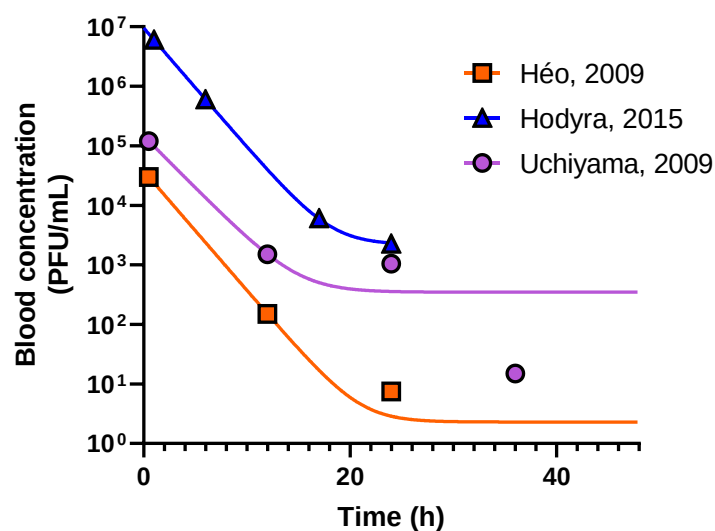


Figure 4: Blood concentrations of phages over time following IP administration with their non-linear regression one-phase decay curves.

Table 2: Estimated half-lives and distribution volumes (Vd) after IP administration of phages.

Author, Year	Animal	Phage	Administered dose (PFU)	Estimated C0 (PFU/mL)	Estimated Vd (administered dose/C0) (mL)	Estimated Half-life (h)
Uchiyama, 2009	Mice	KPP10	5,0E+07	1,5E+05	3,4E+02	1,72
Héo, 2009	Mice	MPK6	5,0E+07	3,8E+04	1,3E+03	1,50
Hodyra, 2015	Mice	F8	1,0E+09	9,5E+06	1,1E+02	1,50

There is some evidence suggesting that small molecules (Molecular Weight < 5000 Da) are predominantly absorbed from visceral peritoneum by diffusion through capillaries and drain into the portal vein (Al Shoyaib, Archie, and Karamyan 2020). In this condition, drugs go through a first liver pass effect. By contrast, Al Shoyaib and al assume that larger molecules including nanoparticles could be taken up by the lymphatics and reach bloodstream via the thoracic duct. In this case, there would be no first liver pass effect.

To explore this hypothesis, we compared, when available, early concentrations of phages in liver against other organs such as spleen after an IP administration. We supposed that in absence of a first liver pass effect, the early phage concentration in these organs should be similar. We found four studies and five data sets from which phage concentrations in liver and spleen were determined less than 2h post IP administration (Dabrowska et al. 2007; Aleshkin et al. 2016; Tiwari et al. 2011; McVay, Velásquez, and Fralick 2007) (Table 3).

Table 3 : Concentrations of phages in liver / concentrations in spleen at earliest time-points of studies with an IP administration.

Author, year	Animal model	Phage	Administered dose (PFU)	Sacrifice time-point (h)	Phage concentration in liver/spleen
McVay, 2007	Mice	Unknown	3,0E+08	0,5	16
Tiwari, 2011	Mice	PA10	5,0E+07	0,5	175
Aleshkin, 2016	Mice	KPV15	1,0E+08	1	41
Dabrowska, 2007	Mice	T4	1,0E+11	1	12
Dabrowska, 2007	Mice	HAP1	1,0E+11	1	9

As observed, phage concentrations in the liver were systematically higher than in spleen. As a comparison, post IV administration, one study reported that phage concentrations in liver and spleen were similar (Inchley 1969). These observations do not support a lymphatic first passage, but rather suggest a first liver pass effect.

Compared to IV route of administration, half-lives tended to be longer and Vd values higher post IP administration. These results suggest that some phages are not immediately delivered inside the bloodstream as they may be first retained in the peritoneum or the liver (Figure 5).

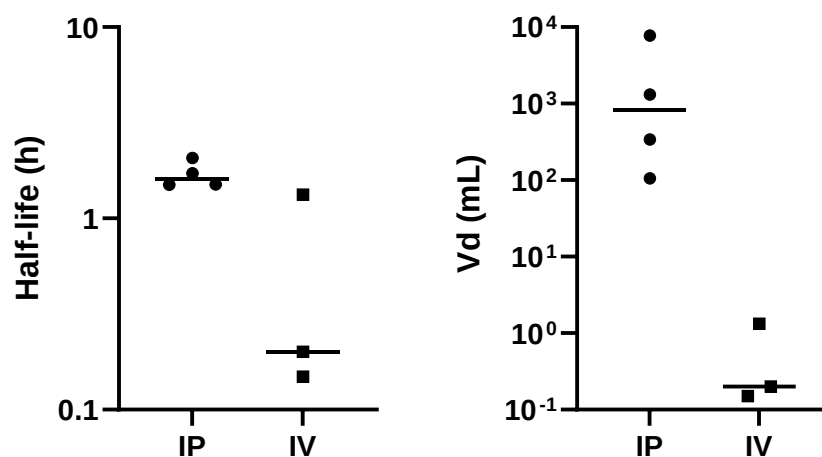


Figure 5 : Estimated Half-lives (left) and Vd (right) of phages in mice post IP or IV administration.

C. Other systemic administration routes: IM and SC

The few articles mentioning an IM (Heo et al. 2009; McVay, Velásquez, and Fralick 2007; Hoffmann 1965) or SC administration (McVay, Velásquez, and Fralick 2007; Pouillot et al. 2012) showed a rapid absorption of phages.

In IM studies, early blood passage was reported (from 3 min to 3 hours post administration, according to the study protocol) and the highest concentrations of phages in blood were found at the first time-point of sacrifice.

Post SC administration, the passage to bloodstream seems to be more delayed than post IM administration. McVay reported that the absorption of phages in the bloodstream was not detected 30 min but only at 12 h post-administration. The study by Pouillot performed in rats showed that the absorption of phage EC200PP was observed 2h post administration (Pouillot et al. 2012).

Next, we examined the literature in which phages were administered by the oral route (*per os*, PO), which is frequently used for conventional drugs. We attempted to determine in what extent phages could cross the intestinal barrier and therefore deduce the bioavailability of phages post PO administration.

D. Oral route

Intestinal barrier is more permeable and less selective than endothelial barrier. After a mucosal layer, which passage depends on size, shape and electrical charges, there is a one-cell-thick internal lining of the gut that contains different types of epithelial cells. Underneath the epithelial layer, there is a thin layer of connective tissue, the lamina propria. Tight junctions between epithelial cells prevent paracellular passage (limited to 10 nm).

1. A non-systematic and variable passage from intestinal space to bloodstream

We found seven data sets extracted from four studies (Table 4) (Jun et al. 2014; Keller and Engley 1958b; Bradley, Kim, and Watson 1963; Międzybrodzki et al. 2017) with PK data in blood after PO administration of phages in mice or rats. In some studies, authors observed a systemic passage of phages after oral or gastric administration by gavage. In some studies, phages were found in blood at the first time of sacrifice (from 5 min (Keller and Engley 1958a) to 30 min (Bradley, Kim, and Watson 1963)). In the other cases, the detection of phages was delayed in blood: no phages were detected in mice blood 1 hour after PO administration of pVp1, but some were recovered at 3 hours time point (Jun et al. 2014). Eventually, some authors reported no detection of phages in blood after PO administration, despite a high amount administered. Międzybrodzki found different results in mice and rats. This author

could not retrieve any phage in blood after PO administration of 10^9 PFU in rats. In mice, the phage A5/80 could reach bloodstream (with use of anti-acids) while phage T4 was practically undetectable in blood (Międzybrodzki et al. 2017) (Figure 6).

Table 4 : PK studies with blood phages concentrations data after PO administration.

Author, year	Animal model	Phage	Administered dose (PFU)
Jun, 2014	Mice	Pvp-1	1,00E+08
Międzybrodzki, 2017	Mice	A5/80	5,00E+06
Sarhan, 2017	Rabbits	unknown	2,00E+08
Bradley, 1963	Mice	MSP8	unknown

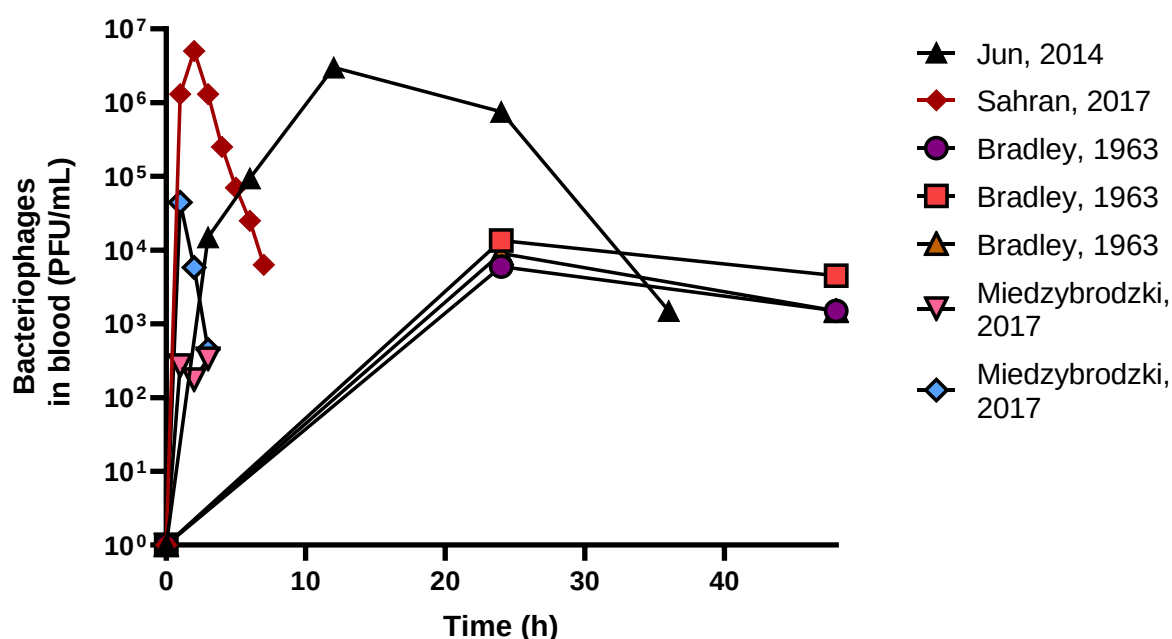


Figure 6 : Blood concentration of phages over time after oral or gastric administration in mice and rabbits in studies with blood detection of bacteriophages.

We attempted to delineate if some criteria accounted for the observed differences. The fastest phages to reach bloodstream and in high quantity was those described by Sarhan. But

in this work, there is no indication about the used phage. Likewise, there is no indication about the phage used in the experiment of Keller. In Miedzybrodzki work, two similar sizes and shape phages, T4 and A5/80 had a different fate, enhancing the fact that size and shape are not the only factors to consider. As for nanoparticles, many factors come into play -size, shape, electrical charge, pH sensitivity,...- rendering absorption of phages unpredictable (Wang et al. 2020).

Sensitivity to low pH and isoelectric points are certainly affecting phages bioavailability. For instance, the low pH values found in the stomach of animals (pH : 3-4 in mice and rats) represent an hostile environment in which a major fraction of administered phages could be inactivated in a few minutes. Phage T4 is sensitive to low pH, which could explain results of Miedzybrodzki. Jun, who used the pVp-1 phage (a T5-like phage (Kim et al. 2012)), which is not sensitive to low pH, obtained highest blood phage concentration, suggesting that size is not a major determinant as T5-like phage particles are about the same length as T4 particles. Besides, several publications report a higher translocation to bloodstream of phages once added in beverages of anti-acids or even yoghurt (Chibani-Chennoufi et al. 2004; Jamalludeen et al. 2009; Międzybrodzki et al. 2017).

We could not determine bioavailability of phages that reached bloodstream due to the imprecise administered dose. In several studies it is indeed difficult to estimate which amount of phages the animals drunk when they were added to beverages *ad libitum*.

In three studies for which the precise dose administered PO was reported, we calculated at different time-points the blood concentration of phages as well as the ratios between maximal blood concentrations and the administered phage doses (Table 5). These data clearly show that although translocation of phages from digestive tract to bloodstream exists, it is nonetheless in very low proportion.

Table 5: Blood concentrations of phages over time after oral administration.

Author, year	Keller and Engley, 1958	Jun, 2014	Miedzybrodzki, 2017
Animal model	Mice	Mice	Mice
Bacteriophage	Unknown	Pvp-1	A5/80
Administered dose (PFU)	1,00E+09	1,00E+08	5,00E+06
Blood sample time-point (h)	0,25		0,25
Blood concentration (PFU/mL)	1,00E+03		2,12E+02
Blood concentration / administered dose	1,00E-06		4,24E-05
Blood sample time-point (h)	1	3	3
Blood concentration (PFU/mL)	2,00E+04	1,50E+04	1,90E+01
Blood concentration / administered dose	2,00E-05	1,50E-04	3,80E-06

2. Mechanisms underlying the translocation

As paracellular passage is unlikely, transcytosis is certainly the preferential path. They are multiple mechanisms underlying endocytosis. It could be passive or mediated by clathrin according to phages (Carroll-Portillo and Lin 2019), or receptor-mediated endocytosis (Lehti et al. 2017). Non-specific macropinocytosis has also been described as an actor of phage internalization (Nguyen et al. 2017). In this study, uptake depends of cells and of the tested phage: lung epithelial cells showed the highest accumulation of phages. Uptake depends on numerous factors, especially size : smallest phages, like T3a, a *Podoviridae*, displays the highest rate of uptake across three cell lines (Bichet et al. 2021).

The intracellular trafficking of phages remains incompletely understood beyond their accumulation within the macropinosomes (Bichet et al. 2021). Phages may also transit through Golgi apparatus and usually reach basal membrane as early as 10 minutes after application on the apical pole of an epithelial layer (Nguyen et al. 2017). It is nevertheless a rare phenomenon since 0.0008% to 0.1% of applied phages could cross different cellular layers. *In vivo*, it is probably even rarer, considering the thick mucus layer that phages have to cross (Barr et al. 2013), which is supported by data obtained from animals.

The ability for phages to cross other physiological barriers are critical questions, as for instance the glomerular filtration that is a major route of elimination of conventional drugs.

E. The glomerular barrier

Glomerular membrane is a thick barrier, made of three core constituents—the glomerular endothelial cell, the basement membrane and visceral epithelial cell (podocyte). Not only each constituent is a tight-mesh layer but also the superposition of the three layers makes unlikely the glomerular filtration of particles > 8 nm. Then, phages should not be present in urine.

Nevertheless, some authors reported the presence of phages in urine after administration by several routes (Table 6). Concentrations of phages in urine were low, generally below to 10^2 PFU/mL. An exception comes from the data reported by Pouillot. After a SC administration of 10^8 PFU, no phage were detected in urines, while after an IP administration of the same phage (EC200PP), a high concentration of phages was found in the urines. As these results contravened the other studies, we hypothesize that a contamination of the urine samples following IP injection took place.

Table 6: Urine concentration after a systemic or oral administration of phages in healthy animals. NA: not available because no blood measure of phage concentration.

Author, year	Animal model	Phage	Administration route	Administered dose	Time-point (h)	Urine (PFU/mL)	Urine/ Blood concentration
Pouillot, 2012	Rat pups	EC200PP	SC	1,0E+08	2	3,0E+01	0,06%
					6	3,0E+01	0,04%
					24	3,0E+01	0,33%
Pouillot, 2012	Rat pups	EC200PP	IP	1,0E+08	2	6,0E+05	60%
					6	1,0E+05	10%
					24	1,5E+04	150%
Schultz, 1965	Mice	T2	IV	1,0E+11	2	6,0E+02	0,01%
				2,0E+09	2	1,8E+02	0,71%
				2,0E+08	2	0,0E+00	0,00%
Nishikawa, 2008	Mice	T4	IP	3,0E+11	4	9.7E+4	NA
					6	5.8E+4	NA
					24	1.6E+4	NA
Reynaud, 1991	Rabbits	CF0103	PO	5,0E+09	1	3,2E+02	NA
					2	3,2E+02	NA

F. The cerebral barrier

1. General considerations and nanoparticles

Brain is considered as a sanctuary, impenetrable by microbes. Blood-brain-barrier is in fact made of several layers (capillary endothelial cells and basement membrane, neuroglial membrane, and glial podocytes, i.e., projections of astrocytes) which considerably limit passage of molecules from bloodstream to brain tissue. Nevertheless, as some viruses can reach brain tissue (CMV, HTLV, HIV), it raises the question of the ability of phages to reach the brain.

The passage of nanoparticles in brain tissues was previously reviewed (van Rooy et al. 2011). The author reported an endothelial transcytosis that seems more difficult than other endothelial cells. Even more than other barriers, paracellular route is unlikely and adsorptive

or receptor-mediated endocytosis into brain endothelial cells is rare. The authors reported that the amount of IV administered nanoparticles that reached the brain tissues represented 0.01 to 0.5% of the initial dose per g of brain tissues. These values included the subtraction of the vascular content, which can account for a significant load, especially when the blood concentration of nanoparticle is high. Indeed, the volume of blood in the brain of mice and rats is between 12 and 25 μ L per gram of tissues (Edvinsson, Nielsen, and Owman 1973).

2. In phages studies

We found four studies that included data from brain tissues following the systemic administration of phages in healthy mice (Table 7). Authors found in all studies phages in brain tissues, especially within the 12 hours following phage administration. From these data, we established the ratios of phage concentration between blood and brain. These calculations included the subtraction of the blood volume.

We found that most phages detected in brain tissues come from the blood vasculature. However, we observed that the ratio between blood and brain increases along time (Figure 7), suggesting that some rare phages are out the vascular sector, without being sure that they reach cerebral parenchyma. The next study by Dubos confirmed this observation.

Table 7: Brain concentration of phages after a systemic administration in healthy animals.

Author, year	Oechslin, 2017	Pouillot, 2012	Keller and Engley, 1958	Pouillot, 2012	Nishikawa, 2008	Nishikawa, 2008
Animal model	Rats	Rats	Mice	Rats	Mice	Mice
Phage	PP1131 cocktail	EC200PP	Unknown	EC200PP	T4	KEP10
Administered dose	1,00E+10	1,00E+08	4,00E+09	1,00E+08	1,00E+11	1,30E+12
Administration route	IV	SC	IP	IP	IP	IP

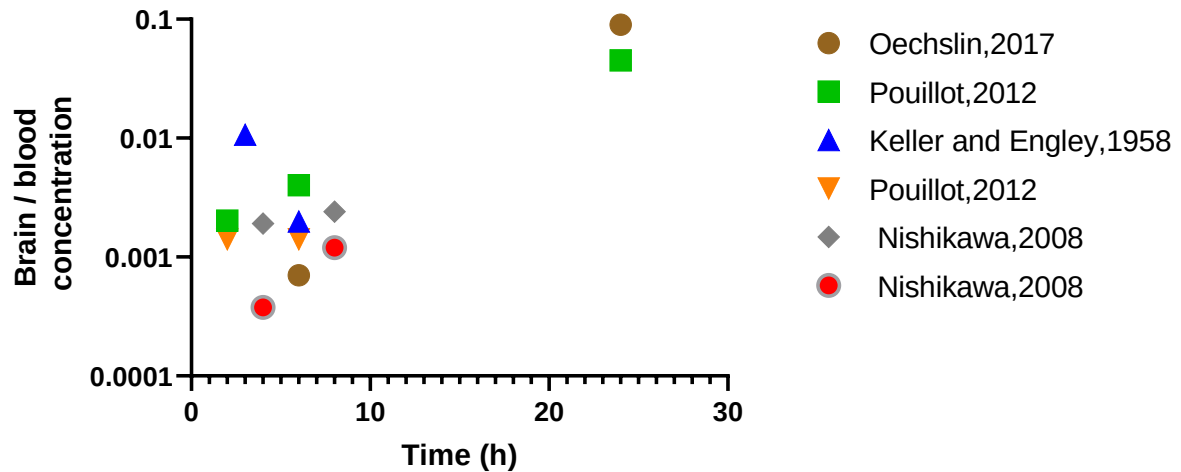


Figure 7: Concentration of phages in brain / concentration in blood according to sacrifice time after systemic phage administration.

3. In Dubos study

Exceptionally, in the Dubos study we have access to individual instead of pooled data. Four mice were sacrificed at each time points to collect blood and brain and determine the load of a phage active against *Shigella dysenteriae* following its IP administration (10^9 PFU). We exploited the individual data to obtain brain/blood ratios of phages (Figure 8).

As suggested by Dubos “The brain level remains at all times below that of the blood, perhaps due to the small blood content of the brain.”, we found that the ratio data support previous findings of an increased ratio along time, suggesting a rare but real passage or sequestration of phages in the brain compartment.

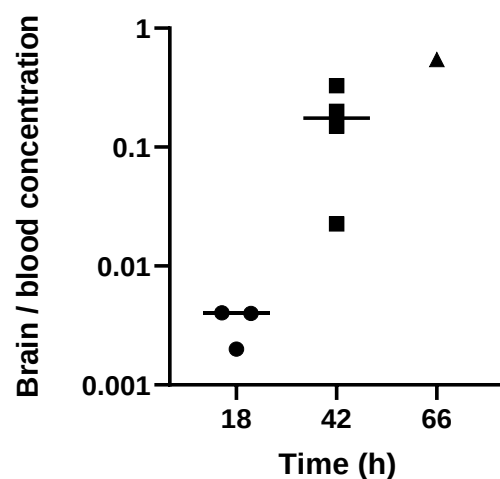


Figure 8: Ratio between brain and blood concentrations of phages after IP administration in individual mice (four mice/time-point, lacking data correspond to samples with phage concentration below limit of quantification, bars are medians).

Besides a limited passage through physiological barriers, the short half-lives we observed in phage studies could also be a potential limit in phage therapy. We showed in the next section that it is the result of an elimination process similar than nanoparticles.

III. METABOLIZATION AND ELIMINATION

There is no metabolization, ie. enzymatic modification, of phages in contrast to some conventional drugs, and we have already discussed the absence of renal filtration. Therefore, we will discuss the involvement of the mononuclear phagocyte system (MPS) in light of what is known from the study of nanoparticles.

A. Nanoparticles and the MPS

The rapid decrease of nanoparticles concentration in the blood as well as the lack of renal elimination and liver transformation strongly suggest that the MPS is involved in nanoparticles elimination. The MPS is a highly and complex evolutionarily conserved subpart of the innate immune system that has been identified as a major defense system against exogen elements. It is acting through phagocytosis and subsequent intracellular destruction of particles or infectious agents. The MPS consists in a family of cells comprising bone marrow progenitors, blood monocytes and tissue macrophages, among which Kupffer cells and splenic macrophages are the most abundant.

Kupffer cells are resident liver macrophages that adhere to the endothelial cells of the blood vessel walls. With non-parenchymal cells they represent about 30% to 35% of total liver cells (Nguyen-Lefebvre and Horuzsko 2015). In addition, splenic macrophages are divided in sub-populations in different anatomical compartments of the red and white pulp regions separated by the marginal zone. They show heterogeneity in their functions as well (Fujiyama et al. 2019).

Nanoparticles are first opsonized by opsonins or other serum proteins that interact with receptors of MPS cells. Nanoparticles are then internalized and degraded (Cataldi et al. 2017). In fact MPS plays a major role, as 80% to 90% of nanoparticles will get engulfed in the liver or the spleen to be degraded (Caron et al. 2012; Borchardt et al. 1994).

The internalization process is modulated by the size of the nanoparticles as well as other characteristics such as their charge. Nanoparticles larger than 15 nm and smaller than 200 nm

tend to be captured by Kupffer cells and splenic macrophages of the marginal zone, whereas particles larger than 200 nm are retained in the red pulp of the spleen (Cataldi et al. 2017).

B. Phages and the MPS

We found an agreement between *in vitro* and *in vivo* studies showing phages uptake by leukocytes and phages accumulation in liver and spleen, respectively (Aronow et al. 1964). Following IV administration, the concentration increased over time in spleen and liver compared to blood (Figures 9 and 10) in the four studies we considered (Table 8). Here, we did not consider IP administration because of the possible first liver pass effect, neither we took into account the work performed by Oechslin that used a phage cocktail from which individual phages were not quantified.

As expected from large nanoparticles (lambda and T4 phages are about 200 nm long), phages are preferentially eliminated in spleen as confirmed with the ratio spleen/blood being higher than the ratio liver/blood.

Table 8: Studies with IV administration of phages in healthy animals with exploitable data in liver and/or spleen.

Author, year	Animal model	Phage	Administered dose (PFU)	Administration route
Inchley, 1969	Mice	T4	5,00E+08	IV
Geier, 1973	Mice	Lambda	2,00E+12	IV
Cerveny, 2002	Mice	153A5	1,00E+08	IV
Miedzybrodzki, 2017	Rats	A 5/80	2,00E+09	IV

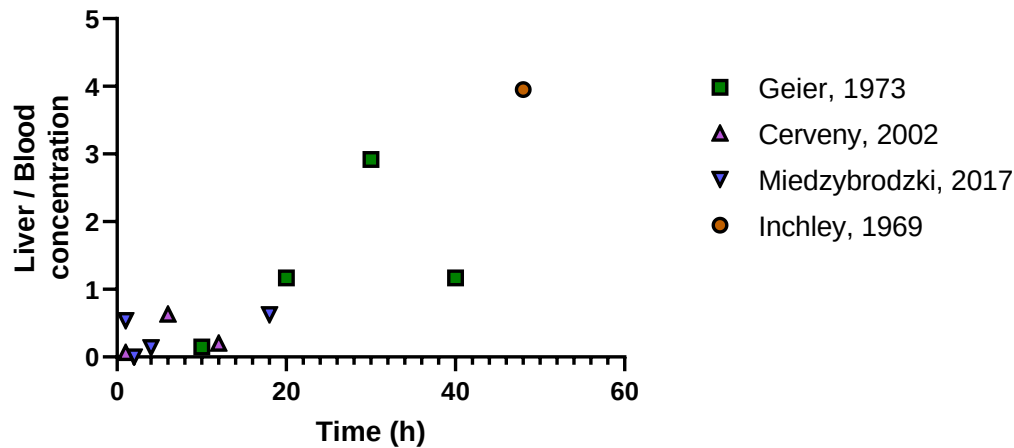


Figure 9: Liver/blood concentration of phages after IV administration in healthy mice.

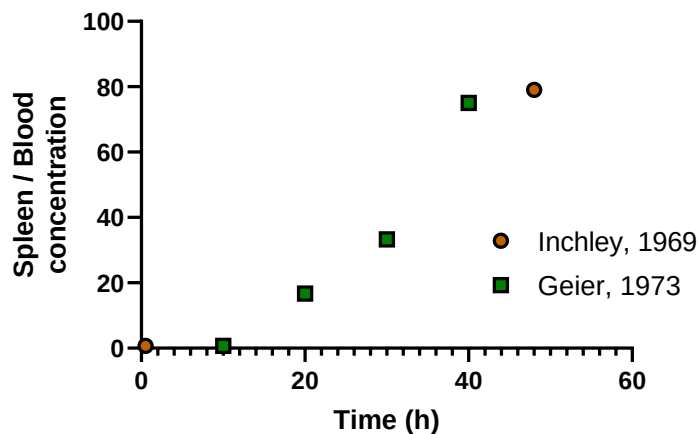


Figure 10: Spleen/blood concentration of phages after IV administration in healthy mice.

Nevertheless, even if the liver and the spleen are the main compartments of phage storage, we found that less than 10% of the systemic administered dose accumulated in these organs. The remaining phages could be located in other organs, engulfed in bone marrow or in lymph nodes. They could also be stored inside cells that have not been destroyed when organs were homogenized. Last but not least, some and perhaps a large proportion of phages may be damaged during their passage into the host and become unable to form plaques.

To conclude, in healthy animals, unfavorable parameters govern phages pharmacokinetics: large size and polarized charge keep phages from passing barriers and the MPS leads to a fast decrease. Nevertheless, the unique property of phages to self-amplify could be game changer in the context of a bacterial infection.

IV. INFECTED ANIMAL

A. Sepsis, an alteration of the host that impacts phage PK

The sepsis corresponds to an over activation of the immune system when fighting against an infection. The first step is the recognition of bacteria by the MPS. These interactions between specific receptors and bacterial components initiate the innate immune response by the activation of several pathways. This leads to the transcription of several genes involved in the inflammatory response including the pro inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8 for example) (Reinhart et al. 2012; Al-Obaidi and Desa 2018; “Revue générale du système immunitaire - Immunologie; troubles allergiques” n.d.). Consequently, the sepsis disrupts the balance between pro and anti-inflammatory cytokines. During the sepsis, the activation of the immune response also includes the complement system.

The dysregulation of cytokines and the activation of the complement induce immune cells attraction and alteration of barriers by affecting tight junctions, which has clinical consequences such as vasodilatation and vascularity permeability increase. This leads to a shift of fluid from intracellular to extracellular compartments raising the distribution volume (Vd). The modification of epithelial and endothelial barriers junctions can also facilitate the passage of large molecule normally retained in the blood compartment.

While in healthy animals phages behave as nanoparticles, in infected animals their capacity to infect bacteria and produce new virions could greatly modify their PK inside a body.

Last point is the hypothetic perturbation of MPS in presence of bacteria towards virus uptake. Some authors argue an increase of inactivation by spleen macrophages in spleen sequestration in case of sepsis (Hodyra-Stefaniak et al. 2015).

More than host modifications induced by sepsis, phage behavior is considerably modified in presence of bacteria.

B. Modification of the phage behavior: from nanoparticle to biological agent

While phage amplification is easily quantified during *in vitro* experiments, its assessment *in vivo* following the passage of phages in blood after a systemic administration in infected animals cannot be done without a comparison with data from healthy animals. We analyzed three studies in which authors reported data following a systemic administration of phages in healthy and in infected animals using the same experimental settings (Table 9 and Figure 11).

Table 9: Studies with IP administration of phages in healthy and infected mice.

Author, Year	Morton, 1944	Tiwari, 2011	Matsuzaki, 2003
Animal	Mice	Mice	Mice
Phage	LP X-S45	PA1Ø	ØMR11
Administered dose (PFU)	5,0E+10	5,0E+07	1,60E+11
Administration route	IP	IP	IP
Bacteria	<i>Shigella paradysenteriae</i> , X-S45	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>S. aureus</i> SA37
Infectious site	Bacteriemia (IP administration)	Bacteriemia (IP administration)	Bacteriemia (IP administration)
Administered dose (CFU)	2,0E+06	5,0E+06	8,0E+08

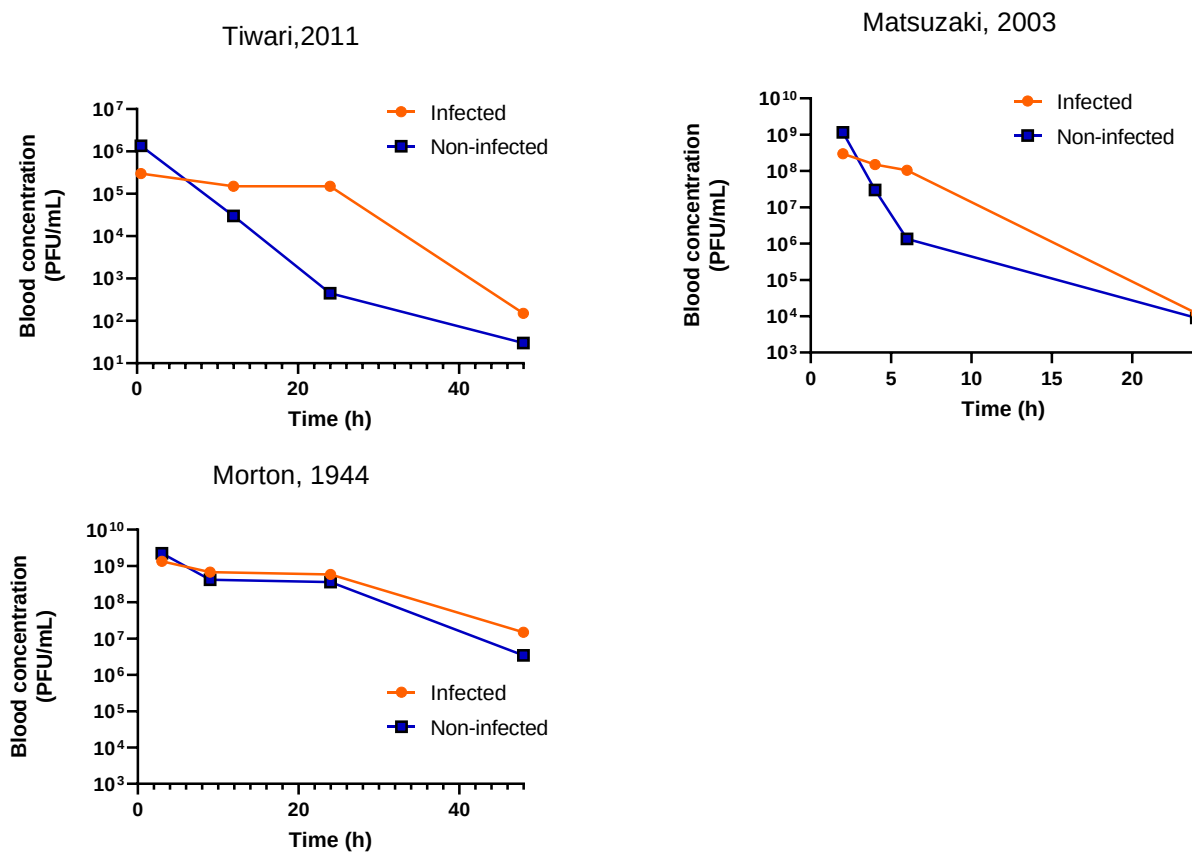


Figure 11: Phage concentration in blood after an IP administration in healthy and infected mice.

In two studies (Tiwari et al. 2011; Matsuzaki et al. 2003), the half-life of phages in the blood of infected animals was extended compared to healthy animals. In the third study (Morton and Perez-Otero 1945), the unusually long half-life of phage LP X-S45 in healthy animals prevented a similar observation. These curves do not follow a one phase decay decrease, which is in favor of phage amplification. It should also be noticed that the first phage concentration in blood was lower in all infected compared to uninfected mice, which can be explained by an increased of V_d or a faster elimination promoted by an over activation of the MPS.

If we could observe phage amplification in the above experiments, in which bacteria and phages were administered in the same compartment (IP administration of phages and bacteria), in clinical cases, phages will most likely be applied away from the infection site.

C. Ability to reach infected organs

While during a sepsis, both phages and bacteria can rapidly encounter each other in the blood, during an infection taking place in other organs phages must first reach their targeted bacteria before to amplify. Here, we examined the work of Dubos et al. who used phages to treat *Shigella dysenteriae* meningitidis, which requires that phages cross the blood-brain-barrier (Dubos, Straus, and Pierce 1943).

Following the intracerebral injection of the bacteria (lethal dose), mice received immediately a single phage treatment by IP. The Figure 12 recapitulates the results of the cerebral concentration of phages over time in infected or uninfected animals.

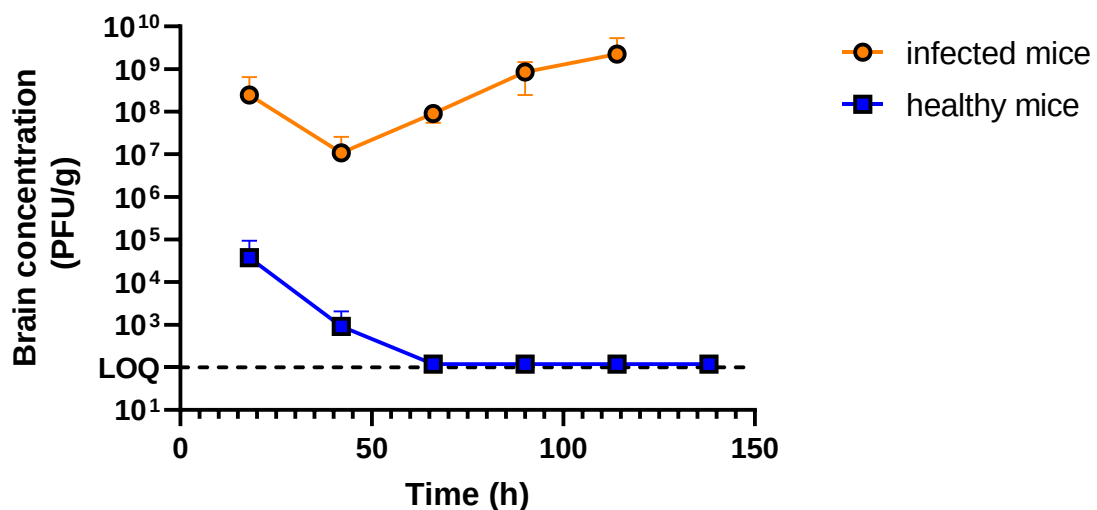


Figure 12: Brain concentrations of LD50 phage after IP administration of 10^9 PFU in uninfected or infected mice. LOQ : limit of quantification. Individual data (four mice per time-point) allowed us to represent mean and SD errors.

Unambiguously, the high level of phages in the brain of infected mice compared to uninfected animals testify of both the blood-brain barrier passage of phages and their amplification.

These data are corroborated by those from Smith *et al.* who found a large number of phages in the brain of animals infected by *E. coli* (Figure 13). While bacteria were administered intracerebrally, the phage “R” was simultaneously IM administered (Smith and Huggins 1982).

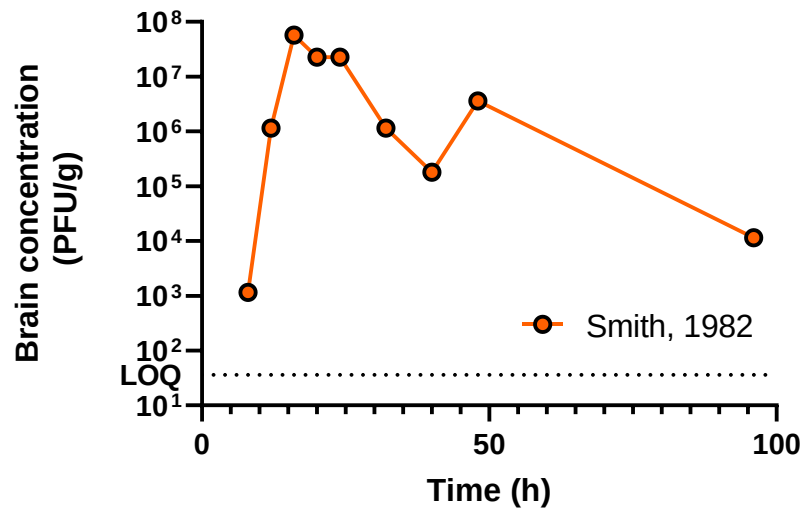


Figure 13: Brain concentrations of phage “R” after IM administration in a murine model of *E. coli* meningitis.

Despite the paucity of data supporting the treatment of a bacterial infection when phages are administered apart from the infected organ, these results indicate that, on one hand, phages are able to cross altered barriers of infected organs, and, on the other hand that once phages reach their target they can amplify and lead to a successful treatment.

V. CONCLUSION :

Our approach to analyze PK studies of phages in light of the data obtained using nanoparticles has illustrated how complex phages PK can be. Indeed, slight variations of their shape or electric charge can modify the PK of phages, preventing a general statement to be applicable for each phage. However, knowing this limitation, data available in the literature do not support the paracellular passage of phages through the epithelial barrier. Nevertheless, some phages cross the intestinal barrier, but their transcellular passage prevent sufficient absorption to propose this route of administration for treatment, unless the infection takes place in the digestive tract.

Beyond the intrinsic properties of phages that can influence their PK, different actors of the innate immune system can also differentially react to the presence of phages, but there is no other route of elimination of phages described than phagocytosis by the MPS.

One of the main limitations of our analysis, despite an extensive search in the literature, is the very large range of experimental settings and an even larger uneven quality of data reported. For instance, data collected were almost exclusively averages without the possibility to access to individual values. We also noted some inconstancies, probably due to errors when transcribing the data including in the units used. Nevertheless, we established half-lives for some phages, which appear to be as short as for the largest nanoparticles.

These observations support that in the context of an infection, the administered phage dose must be high enough to ensure that enough particles reach the infection site before being phagocytosed. Yet, septic condition considerably alters the epithelial barrier and modifies the volumes of distribution, which could help more phages to reach their target. In addition, whether sepsis affects the ability of MPS to manage phages remains unknown. Perhaps, one of the best examples of a balance between unfavorable PK and successful outcome of phage therapy comes from the treatment of meningitidis. As phages cannot cross the blood-brain barrier, the overall efficacy of the treatment testify that phages found an efficient way to cross this barrier, which demonstrates that the PK characteristics of phages is considerably modified during an infection.

The amplification of phages is such that one could certainly in some cases overcome extensive PK data obtention in healthy animals before resorting to the bacteriophage in animals or individuals with severe infection. However, it should be remembered that in this case the systemic administration of the phage, must be done with a high dose because we have shown that the volume of distribution is much higher than the plasma volume and that it is even higher in the case of sepsis.

Due to the ability of phages to amplify in infectious site, compilation of PK and PD data are required to grasp biofate of phages in infected individuals. To reach such stage, PK/PD mathematical models are being developed. Such models should considerably limit the number of animals needed to complete such studies. Ultimately, it is expected that these models would inform on the most appropriate dose needed to reach efficiency in phage therapy (Chow 2020).

- Al Shoyaib, Abdullah, Sabrina Rahman Archie, and Vardan T. Karamyan. 2020. "Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should It Be Used in Experimental Animal Studies?" *Pharmaceutical Research* 37 (1): 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>.
- Aleshkin, A. V., O. N. Ershova, N. V. Volozhantsev, E. A. Svetoch, A. V. Popova, E. O. Rubalskii, A. I. Borzilov, et al. 2016. "Phagebiotics in Treatment and Prophylaxis of Healthcare-Associated Infections." *Bacteriophage* 6 (4): e1251379. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1251379>.
- Al-Obaidi, Mazen M. Jamil, and Mohd Nasir Mohd Desa. 2018. "Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial-Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain." *Cellular and Molecular Neurobiology* 38 (7): 1349–68. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0609-2>.
- Aminov, Rustam I. 2010. "A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future." *Frontiers in Microbiology* 1: 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.
- Andes, D., and W. A. Craig. 1998. "In Vivo Activities of Amoxicillin and Amoxicillin-Clavulanate against *Streptococcus Pneumoniae*: Application to Breakpoint Determinations." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (9): 2375–79. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.9.2375>.
- Aronow, Rita, David Danon, Avraham Shahar, and Moshe Aronson. 1964. "ELECTRON MICROSCOPY OF IN VITRO ENDOCYTOSIS OF T2 PHAGE BY CELLS FROM RABBIT PERITONEAL EXUDATE." *Journal of Experimental Medicine* 120 (5): 943–54. <https://doi.org/10.1084/jem.120.5.943>.
- Aslam, Saima, Elizabeth Lampley, Darcy Wooten, Maile Karris, Constance Benson, Steffanie Strathdee, and Robert T. Schooley. 2020. "Lessons Learned From the First 10 Consecutive Cases of Intravenous Bacteriophage Therapy to Treat Multidrug-Resistant Bacterial Infections at a Single Center in the United States." *Open Forum Infectious Diseases* 7 (9). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa389>.
- Barr, Jeremy J., Rita Auro, Mike Furlan, Katrine L. Whiteson, Marcella L. Erb, Joe Pogliano, Aleksandr Stotland, et al. 2013. "Bacteriophage Adhering to Mucus Provide a Non-Host-Derived Immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10771–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>.
- Bichet, Marion C., Wai Hoe Chin, William Richards, Yu-Wei Lin, Laura Avellaneda-Franco, Catherine A. Hernandez, Arianna Oddo, et al. 2021. "Bacteriophage Uptake by Mammalian Cell Layers Represents a Potential Sink That May Impact Phage Therapy." *iScience* 24 (4): 102287. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102287>.
- Blot, Stijn I., Federico Pea, and Jeffrey Lipman. 2014. "The Effect of Pathophysiology on Pharmacokinetics in the Critically Ill Patient--Concepts Appraised by the Example of Antimicrobial Agents." *Advanced Drug Delivery Reviews* 77 (November): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.07.006>.
- Borchardt, G., S. Brandriss, J. Kreuter, and S. Margel. 1994. "Body Distribution of ⁷⁵Se-Radiolabeled Silica Nanoparticles Covalently Coated with Co-Functionalized Surfactants After Intravenous Injection in Rats." *Journal of Drug Targeting* 2 (1): 61–77. <https://doi.org/10.3109/10611869409015894>.
- Bradley, S. G., Y. B. Kim, and D. W. Watson. 1963. "Immune Response by the Mouse to Orally Administered Actinophage." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 113 (3): 686–88. <https://doi.org/10.3181/00379727-113-28462>.

- Cano, Edison J, Katherine M Caflisch, Paul L Bollyky, Jonas D Van Belleghem, Robin Patel, Joseph Fackler, Michael J Brownstein, et al. 2021. "Phage Therapy for Limb-Threatening Prosthetic Knee *Klebsiella Pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-Biofilm Activity." *Clinical Infectious Diseases* 73 (1): e144–51. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa705>.
- Caron, W P, G Song, P Kumar, S Rawal, and W C Zamboni. 2012. "Interpatient Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability of Carrier-Mediated Anticancer Agents." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 91 (5): 802–12. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.12>.
- Carroll-Portillo, Amanda, and Henry C. Lin. 2019. "Bacteriophage and the Innate Immune System: Access and Signaling." *Microorganisms* 7 (12): 625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120625>.
- Cataldi, Mauro, Chiara Vigliotti, Teresa Mosca, MariaRosaria Cammarota, and Domenico Capone. 2017. "Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6): 1249. <https://doi.org/10.3390/ijms18061249>.
- Cervený, Karen E., Angelo DePaola, Donna H. Duckworth, and Paul A. Gulig. 2002. "Phage Therapy of Local and Systemic Disease Caused by *Vibrio Vulnificus* in Iron-Dextran-Treated Mice." *Infection and Immunity* 70 (11): 6251–62.
- Chibani-Chennoufi, Sandra, Josette Sidoti, Anne Bruttin, Elizabeth Kutter, Shafiq Sarker, and Harald Brüssow. 2004. "In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia Coli* Phages: Implications for Phage Therapy." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2558–69. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2558-2569.2004>.
- Cho, Wan-Seob, Minjung Cho, Jinyoung Jeong, Mina Choi, Hea-Young Cho, Beom Seok Han, Sheen Hee Kim, et al. 2009. "Acute Toxicity and Pharmacokinetics of 13 Nm-Sized PEG-Coated Gold Nanoparticles." *Toxicology and Applied Pharmacology* 236 (1): 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.023>.
- Chow, Michael Y T. 2020. "Pharmacokinetics and Time-Kill Study of Inhaled Antipseudomonal Bacteriophage Therapy in Mice | *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*" 65 (1): e01470-20.
- Dabrowska, Krystyna, Maria Zembala, Janusz Boratynski, Kinga Switala-Jelen, Joanna Wietrzyk, Adam Opolski, Katarzyna Szczauńska, Marek Kujawa, Joanna Godlewska, and Andrzej Gorski. 2007. "Hoc Protein Regulates the Biological Effects of T4 Phage in Mammals." *Archives of Microbiology* 187 (6): 489–98. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0216-y>.
- Deak, Dalia, Kevin Outtersen, John H. Powers, and Aaron S. Kesselheim. 2016. "Progress in the Fight Against Multidrug-Resistant Bacteria? A Review of U.S. Food and Drug Administration–Approved Antibiotics, 2010–2015." *Annals of Internal Medicine* 165 (5): 363. <https://doi.org/10.7326/M16-0291>.
- Dedrick, Rebekah M., Carlos A. Guerrero-Bustamante, Rebecca A. Garlena, Daniel A. Russell, Katrina Ford, Kathryn Harris, Kimberly C. Gilmour, et al. 2019. "Engineered Bacteriophages for Treatment of a Patient with a Disseminated Drug-Resistant *Mycobacterium Abscessus*." *Nature Medicine* 25 (5): 730–33. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
- Dublanche Alain. 2017. *Autobiographie de Félix d'Hérelle Les Pérégrinations d'un Bactériologiste*. Editions Médicales Internationales.
- Dubos, René J., June Hookey Straus, and Cynthia Pierce. 1943. "THE MULTIPLICATION OF BACTERIOPHAGE IN VIVO AND ITS PROTECTIVE EFFECT AGAINST AN EXPERIMENTAL

- INFECTION WITH SHIGELLA DYSENTERIAE." *The Journal of Experimental Medicine* 78 (3): 161–68.
- Edvinsson, L., K. C. Nielsen, and C. Owman. 1973. "Circadian Rhythm in Cerebral Blood Volume of Mouse." *Experientia* 29 (4): 432–33. <https://doi.org/10.1007/BF01926763>.
- Ernsting, Mark J., Mami Murakami, Aniruddha Roy, and Shyh-Dar Li. 2013. "Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles." *Journal of Controlled Release* 172 (3): 782–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.013>.
- Farkas, Michelle E., Ioana L. Aanei, Christopher R. Behrens, Gary J. Tong, Stephanie T. Murphy, James P. O'Neil, and Matthew B. Francis. 2013. "PET Imaging and Biodistribution of Chemically Modified Bacteriophage MS2." *Molecular Pharmaceutics* 10 (1): 69–76. <https://doi.org/10.1021/mp3003754>.
- Feng, Runliang, Zhimei Song, and Guangxi Zhai. 2012. "Preparation and in Vivo Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PCL-PEG-PCL Triblock Copolymeric Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine*, July, 4089. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33607>.
- Ferry, Tristan, Camille Kolenda, Cécile Batailler, Claude-Alexandre Gustave, Sébastien Lustig, Matthieu Malatray, Cindy Fevre, et al. 2020. "Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing S. Aureus Prosthetic Knee Infection." *Frontiers in Medicine* 7 (November): 570572. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.570572>.
- Fujiyama, Satoshi, Chigusa Nakahashi-Oda, Fumie Abe, Yaqiu Wang, Kazuki Sato, and Akira Shibuya. 2019. "Identification and Isolation of Splenic Tissue-Resident Macrophage Sub-Populations by Flow Cytometry." *International Immunology* 31 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy064>.
- Geier, M. R., M. E. Trigg, and C. R. Merrill. 1973. "Fate of Bacteriophage Lambda in Non-Immune Germ-Free Mice." *Nature* 246 (5430): 221–23.
- Heo, Yun-Jeong, Yu-Rim Lee, Hyun-Hee Jung, JungEun Lee, GwangPyo Ko, and You-Hee Cho. 2009. "Antibacterial Efficacy of Phages against Pseudomonas Aeruginosa Infections in Mice and Drosophila Melanogaster." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6): 2469–74. <https://doi.org/10.1128/AAC.01646-08>.
- Hérelle, Félix d'. 1917. "Sur Un Microbe Invisible Antagoniste Des Bacilles Dysenteriques. Compte Rendus de l'académie Des Sciences de Paris."
- Hodyra-Stefaniak, Katarzyna, Paulina Miernikiewicz, Jarosław Drapała, Marek Drab, Ewa Jończyk-Matysiak, Dorota Lecion, Zuzanna Kaźmierczak, et al. 2015. "Mammalian Host-Versus-Phage Immune Response Determines Phage Fate in Vivo." *Scientific Reports* 5 (October). <https://doi.org/10.1038/srep14802>.
- Hoffmann, M. 1965. "Animal Experiments on Mucosal Passage and Absorption Viraemia of T3 Phages after Oral, Trachéal and Rectal Administration." *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 198 (4): 371–90.
- Hoshyar, Nazanin, Samantha Gray, Hongbin Han, and Gang Bao. 2016. "The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction." *Nanomedicine (London, England)* 11 (6): 673–92. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>.
- Hoyle, N., P. Zhvaniya, N. Balarjishvili, D. Bolkvadze, L. Nadareishvili, D. Nizharadze, J. Wittmann, C. Rohde, and M. Kutateladze. 2018. "Phage Therapy against Achromobacter Xylosoxidans Lung Infection in a Patient with Cystic Fibrosis: A Case

- Report." *Research in Microbiology* 169 (9): 540–42.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.05.001>.
- Hyman, Paul, and Stephen T. Abedon. 2012. "Smaller Fleas: Viruses of Microorganisms." *Scientifica* 2012: 1–23. <https://doi.org/10.6064/2012/734023>.
- "ICTV 9th Report (2011)." n.d. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/67/caudovirales.
- Inchley, C. J. 1969. "The Activity of Mouse Kupffer Cells Following Intravenous Injection of T4 Bacteriophage." *Clinical and Experimental Immunology* 5 (2): 173–87.
- Jamalludeen, Nidham, Roger P. Johnson, Patricia E. Shewen, and Carlton L. Gyles. 2009. "Evaluation of Bacteriophages for Prevention and Treatment of Diarrhea Due to Experimental Enterotoxigenic Escherichia Coli O149 Infection of Pigs." *Veterinary Microbiology* 136 (1–2): 135–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.021>.
- Jun, Jin Woo, Tae Hoon Shin, Ji Hyung Kim, Sang Phil Shin, Jee Eun Han, Gang Joon Heo, Mahanama De Zoysa, Gee Wook Shin, Ji Young Chai, and Se Chang Park. 2014. "Bacteriophage Therapy of a Vibrio Parahaemolyticus Infection Caused by a Multiple-Antibiotic-Resistant O3:K6 Pandemic Clinical Strain." *The Journal of Infectious Diseases* 210 (1): 72–78. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu059>.
- Keller, R., and F. B. Engley. 1958a. "Fate of Bacteriophage Particles Introduced into Mice by Various Routes." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 98 (3): 577–80.
- . 1958b. "Fate of Bacteriophage Particles Introduced into Mice by Various Routes." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 98 (3): 577–80. <https://doi.org/10.3181/00379727-98-24112>.
- Kim, Ji Hyung, Jin Woo Jun, Casiano H. Choresca, Sang Phil Shin, Jee Eun Han, and Se Chang Park. 2012. "Complete Genome Sequence of a Novel Marine Siphovirus, PVp-1, Infecting Vibrio Parahaemolyticus." *Journal of Virology* 86 (12): 7013–14. <https://doi.org/10.1128/JVI.00742-12>.
- Lehti, Timo A., Maria I. Pajunen, Maria S. Skog, and Jukka Finne. 2017. "Internalization of a Polysialic Acid-Binding Escherichia Coli Bacteriophage into Eukaryotic Neuroblastoma Cells." *Nature Communications* 8 (1): 1915. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02057-3>.
- Lin, Derek M., Britt Koskella, and Henry C. Lin. 2017. "Phage Therapy: An Alternative to Antibiotics in the Age of Multi-Drug Resistance." *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 8 (3): 162–73. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.
- Lin, Tzu-Lung, Pei-Fang Hsieh, Yu-Tsung Huang, Wei-Ching Lee, Yi-Ting Tsai, Po-An Su, Yi-Jiun Pan, Chun-Ru Hsu, Meng-Chuan Wu, and Jin-Town Wang. 2014. "Isolation of a Bacteriophage and Its Depolymerase Specific for K1 Capsule of Klebsiella Pneumoniae: Implication in Typing and Treatment." *The Journal of Infectious Diseases* 210 (11): 1734–44. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu332>.
- Mallick, Rohit, and Jansay Chibber. 2009. "Protection With Bacteriophage KØ1 Against Fatal Klebsiella Pneumoniae-Induced Burn Wound Infection in Mice - PubMed" 42 (2): 134–40.
- Matsuzaki, Shigenobu, Masaharu Yasuda, Hiroshi Nishikawa, Masayuki Kuroda, Takako Ujihara, Taro Shuin, Yuan Shen, et al. 2003. "Experimental Protection of Mice against

- Lethal Staphylococcus Aureus Infection by Novel Bacteriophage Phi MR11." *The Journal of Infectious Diseases* 187 (4): 613–24. <https://doi.org/10.1086/374001>.
- McVay, Catherine S., Marisela Velásquez, and Joe A. Fralick. 2007. "Phage Therapy of Pseudomonas Aeruginosa Infection in a Mouse Burn Wound Model." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (6): 1934–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01028-06>.
- Merril, C. R., B. Biswas, R. Carlton, N. C. Jensen, G. J. Creed, S. Zullo, and S. Adhya. 1996. "Long-Circulating Bacteriophage as Antibacterial Agents." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (8): 3188–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3188>.
- Michen, B., and T. Graule. 2010. "Isoelectric Points of Viruses." *Journal of Applied Microbiology* 109 (2): 388–97. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>.
- Międzybrodzki, Ryszard, Marlena Kłak, Ewa Jończyk-Matysiak, Barbara Bubak, Anna Wójcik, Marta Kaszowska, Beata Weber-Dąbrowska, Małgorzata Łobocka, and Andrzej Górski. 2017. "Means to Facilitate the Overcoming of Gastric Juice Barrier by a Therapeutic Staphylococcal Bacteriophage A5/80." *Frontiers in Microbiology* 8: 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00467>.
- Morton, Harry E., and J. Enrique Perez-Otero. 1945. "The Increase of Bacteriophage in Vivo During Experimental Infections with Shigella Paradyserteriae, Flexner, in Mice." *Journal of Bacteriology* 49 (3): 237–44.
- Nguyen, Sophie, Kristi Baker, Benjamin S. Padman, Ruzeen Patwa, Rhys A. Dunstan, Thomas A. Weston, Kyle Schlosser, et al. 2017. "Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers." *MBio* 8 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17>.
- Nguyen-Lefebvre, Anh Thu, and Anatolij Horuzsko. 2015. "Kupffer Cell Metabolism and Function." *Journal of Enzymology and Metabolism* 1 (1): 101.
- Nishikawa, H., M. Yasuda, J. Uchiyama, M. Rashel, Y. Maeda, I. Takemura, S. Sugihara, et al. 2008. "T-Even-Related Bacteriophages as Candidates for Treatment of Escherichia Coli Urinary Tract Infections." *Archives of Virology* 153 (3): 507–15. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0031-4>.
- Oechslin, Frank, Philippe Piccardi, Stefano Mancini, Jérôme Gabard, Philippe Moreillon, José M. Entenza, Gregory Resch, and Yok-Ai Que. 2017. "Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears Pseudomonas Aeruginosa Infection in Endocarditis and Reduces Virulence." *The Journal of Infectious Diseases* 215 (5): 703–12. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>.
- Pouillot, Flavie, Maryline Chomton, Hélène Blois, Celine Courroux, Julien Noelig, Philippe Bidet, Edouard Bingen, and Stéphane Bonacorsi. 2012. "Efficacy of Bacteriophage Therapy in Experimental Sepsis and Meningitis Caused by a Clone O25b:H4-ST131 Escherichia Coli Strain Producing CTX-M-15." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (7): 3568–75. <https://doi.org/10.1128/AAC.06330-11>.
- Prasuhn, Duane E., Pratik Singh, Erica Strable, Steven Brown, Marianne Manchester, and M. G. Finn. 2008. "Plasma Clearance of Bacteriophage Qbeta Particles as a Function of Surface Charge." *Journal of the American Chemical Society* 130 (4): 1328–34. <https://doi.org/10.1021/ja075937f>.
- Reinhart, Konrad, Michael Bauer, Niels C. Riedemann, and Christiane S. Hartog. 2012. "New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers." *Clinical Microbiology Reviews* 25 (4): 609–34. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-12>.
- "Revue Générale de La Pharmacocinétique - Pharmacologie Clinique - Édition Professionnelle Du Manuel MSD." n.d. Accessed May 17, 2020.

- <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/pharmacologie-clinique/pharmacocin%C3%A9tique/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-de-la-pharmacocin%C3%A9tique>.
- “Revue générale du système immunitaire - Immunologie; troubles allergiques.” n.d. Édition professionnelle du Manuel MSD. Accessed November 8, 2020. <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/immunologie-troubles-allergiques/biologie-du-syst%C3%A8me-immunitaire/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-du-syst%C3%A8me-immunitaire>.
- Rooy, Inge van, Serpil Cakir-Tascioglu, Wim E. Hennink, Gert Storm, Raymond M. Schiffelers, and Enrico Mastrobattista. 2011. “In Vivo Methods to Study Uptake of Nanoparticles into the Brain.” *Pharmaceutical Research* 28 (3): 456–71. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0291-7>.
- Sarhan R Sarhan. 2017. “Study the Pharmacokinetic of the Staphylococcus Aureus Specific Bacteriophage in Healthy Animals,” 2017, Journal of Entomology and Zoology Studies edition, sec. 5(6).
- Schooley, Robert T., Biswajit Biswas, Jason J. Gill, Adriana Hernandez-Morales, Jacob Lancaster, Lauren Lessor, Jeremy J. Barr, et al. 2017. “Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant Acinetobacter Baumannii Infection.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>.
- Serwer, Philip, Elena T. Wright, and John C. Lee. 2019. “High Murine Blood Persistence of Phage T3 and Suggested Strategy for Phage Therapy.” *BMC Research Notes* 12 (1): 560. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4597-1>.
- Singla, S., K. Harjai, K. Raza, S. Wadhwa, O. P. Katare, and S. Chhibber. 2016. “Phospholipid Vesicles Encapsulated Bacteriophage: A Novel Approach to Enhance Phage Biodistribution.” *Journal of Virological Methods* 236 (October): 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.002>.
- Smith, H. W., and M. B. Huggins. 1982. “Successful Treatment of Experimental Escherichia Coli Infections in Mice Using Phage: Its General Superiority over Antibiotics.” *Journal of General Microbiology* 128 (2): 307–18. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-2-307>.
- Sulkin, S. Edward, Richard A. Finkelstein, and Eugene D. Rosenblum. 1957. “Effect of Zymosan on Bacteriophage Clearance.” *Science* 125 (3251): 742–43. <https://doi.org/10.1126/science.125.3251.742>.
- Terwilliger, Austen, Justin Clark, Maile Karris, Haroldo Hernandez-Santos, Sabrina Green, Saima Aslam, and Anthony Maresso. 2021. “Phage Therapy Related Microbial Succession Associated with Successful Clinical Outcome for a Recurrent Urinary Tract Infection.” *Viruses* 13 (10): 2049. <https://doi.org/10.3390/v13102049>.
- Tiwari, Birendra R., Shukho Kim, Marzia Rahman, and Jungmin Kim. 2011. “Antibacterial Efficacy of Lytic Pseudomonas Bacteriophage in Normal and Neutropenic Mice Models.” *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 49 (6): 994–99. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1512-4>.
- Turner, Dann, Andrew M. Kropinski, and Evelien M. Adriaenssens. 2021. “A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy.” *Viruses* 13 (3): 506. <https://doi.org/10.3390/v13030506>.
- Uchiyama, Jumpei, Yoshihiro Maeda, Iyo Takemura, Russ Chess-Williams, Hiroshi Wakiguchi, and Shigenobu Matsuzaki. 2009. “Blood Kinetics of Four Intraperitoneally Administered Therapeutic Candidate Bacteriophages in Healthy and Neutropenic

- Mice." *Microbiology and Immunology* 53 (5): 301–4. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00125.x>.
- Vitiello, Christal L., Carl R. Merrill, and Sankar Adhya. 2005. "An Amino Acid Substitution in a Capsid Protein Enhances Phage Survival in Mouse Circulatory System More than a 1000-Fold." *Virus Research* 114 (1–2): 101–3. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.05.014>.
- Wang, Yuanyuan, Chao Pi, Xianhu Feng, Yi Hou, Ling Zhao, and Yumeng Wei. 2020. "The Influence of Nanoparticle Properties on Oral Bioavailability of Drugs." *International Journal of Nanomedicine* Volume 15 (August): 6295–6310. <https://doi.org/10.2147/IJN.S257269>.
- Wommack, K. E., and R. R. Colwell. 2000. "Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 64 (1): 69–114. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000>.
- Yu, Tian, Dallin Hubbard, Abhijit Ray, and Hamidreza Ghandehari. 2012. "In Vivo Biodistribution and Pharmacokinetics of Silica Nanoparticles as a Function of Geometry, Porosity and Surface Characteristics." *Journal of Controlled Release* 163 (1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.046>.
- Zaldastanishvili, Elisabed, Lika Leshkasheli, Mariam Dadiani, Lia Nadareishvili, Lia Askilashvili, Nino Kvatadze, Marina Goderdzishvili, Mzia Kutateladze, and Nana Balarjishvili. 2021. "Phage Therapy Experience at the Eliava Phage Therapy Center: Three Cases of Bacterial Persistence." *Viruses* 13 (10): 1901. <https://doi.org/10.3390/v13101901>.
- Zhvania, Pikria, Naomi Sulinger Hoyle, Lia Nadareishvili, Dea Nizharadze, and Mzia Kutateladze. 2017. "Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome." *Frontiers in Medicine* 4 (July): 94. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00094>.

2. Étude *in vivo* de phagothérapie expérimentale chez l'animal couplée à un modèle PK/PD

La pharmacodynamie (PD) est l'étude de l'effet du médicament sur l'organisme. Comme tout traitement anti-infectieux, l'effet pharmacodynamique se porte sur la bactérie-cible. Alors que les paramètres caractérisant le cycle infectieux d'un bactériophage sont parfaitement connus *in vitro* dans des conditions standardisées, les conditions environnementales modifient considérablement le cycle infectieux (76). Il demeure donc difficile de déterminer précisément les paramètres du cycle infectieux lorsque bactériophages et bactéries se rencontrent dans un organisme animal ou humain. La quantification de l'effet pharmacodynamique du bactériophage, à savoir la décroissance bactérienne, est néanmoins approchée par différents modèles. Les facteurs entrant en compte dans ces modèles sont : la population de bactériophages, les populations bactériennes sensibles et résistantes au bactériophage, auxquelles a été ajouté depuis peu le système immunitaire de l'hôte, et plus particulièrement le système immunitaire inné. Certains modèles intègrent aussi des mécanismes d'échappement au système immunitaire, tels que les biofilms (65).

Compilant les résultats des deux approches PK et PD, le modèle PK/PD permet la description de l'évolution dans le temps de l'intensité de l'effet en réponse à l'administration d'une dose de médicament. C'est sur cette modélisation que reposent les schémas d'administration des antibiotiques par exemple. Certains antibiotiques s'administrent en une dose journalière, d'autres en perfusion continue. Les modèles connus de PK/PD pour les antibiotiques ne s'appliquent évidemment pas aux bactériophages et il n'existe pas modèle PK/PD en phagothérapie actuellement.

Toutefois, à partir de modèles mathématiques basés sur des équations différentielles prenant en compte les populations de bactéries et de bactériophages, et la réponse immunitaire de l'hôte, Payne a proposé deux schémas thérapeutiques différents de phagothérapie, qui sont une première approche PK/PD (77) :

- La phagothérapie dite « passive » où un grand nombre de bactériophages sont administrés précocement au cours d'une infection. Dans ce cas, les bactériophages tuent suffisamment de bactéries pour contrôler l'infection dès la rencontre, sans recours aux nouveaux bactériophages produits. La phagothérapie « passive » ne peut

s'envisager que dans le cadre d'une infection aigue où un traitement peut s'appliquer localement, idéalement une plaie cutanée ou une cystite simple.

- La phagothérapie dite « active », où le nombre de bactériophages étant plus faible, l'amplification du bactériophage devient essentielle au succès de la phagothérapie. La phagothérapie « active » a vocation à traiter la plupart des infections en pratique clinique et nous verrons dans la partie II.B-2 que dans ce cas, la concentration bactérienne, le moment d'administration des bactériophages est critique, la dose administrée et les paramètres du couple bactériophage-bactérie sont critiques. (78).

La modélisation PK/PD de la phagothérapie « active », sur laquelle j'ai travaillé avec l'équipe de biostatisticiens de l'unité IAME, est le sujet de l'article présenté ci-après.

Title

Combination of *in vivo* phage therapy data with *in silico* model highlights key parameters for treatment efficacy

Authors

Raphaëlle Delattre^{1,2*}, Jérémy Seurat^{2*}, Feyrouz Haddad^{1,2}, Thu-Thuy Nguyen², Baptiste Gaborieau^{1,2,3}, Rokhaya Kane¹, Nicolas Dufour⁴, Jean-Damien Ricard^{2,3}, Jérémie Guedj^{2**} et Laurent Debarbieux^{1**}

Affiliations

1 Institut Pasteur, Université de Paris, Bacteriophage, Bacterium, Host Laboratory, Paris F-75015 France

2 Université de Paris, INSERM, IAME, Paris F-75006, France

3 APHP, Hôpital Louis Mourier, DMU ESPRIT, Service de Médecine Intensive Réanimation, Colombes, France.

4 Centre Hospitalier René Dubos, Cergy Pontoise F-95503, France

* : equal contribution

** : corresponding authors

Lead contact: Laurent Debarbieux (laurent.debarbieux@pasteur.fr)

Summary

The clinical (re)development of bacteriophage (phage) therapy to treat antibiotic resistant infections faces the challenge of understanding the dynamics of phage-bacteria interactions in the *in vivo* context. Here we developed a general strategy coupling *in vitro* and *in vivo* experiments with a mathematical model to characterize the interplay between phage and bacteria during pneumonia induced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. The model estimates several key parameters for phage therapeutic efficacy. In particular, it quantifies the impact of dose and route of phage administration as well as the synergism of phage and the innate immune response on bacterial clearance. Simulations predict a limited impact of the intrinsic phage characteristics in agreement with the current semi-empirical choices of phages for compassionate treatments. Model-based approaches will foster the deployment of future phage therapy clinical trials.

Keywords

Bacteriophage, antibiotic resistance, bacterial infection, pneumonia, mathematical model, innate immunity, simulation

INTRODUCTION

The pronounced slowdown in the discovery of new antibiotics to treat bacterial infections caused by multidrug resistant (MDR) pathogens has revived the interest for bacteriophages (phages), viruses infecting bacteria (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Kortright et al., 2019). Pre-clinical experiments and several clinical cases reports have demonstrated the potential of phages to successfully treat infections caused by MDR bacteria (Aslam et al., 2020; Bull et al., 2002; Corbellino et al., 2020; Jennes et al., 2017; Melo et al., 2020; Schooley et al., 2017). These successes are nonetheless balanced by unreported failures as well as disappointing clinical studies (Jault et al., 2019; Leitner et al., 2020; Sarker et al., 2016), showing that translation from experimental results to clinical trials remains challenging.

A major milestone for a widespread use in human populations is the determination of the optimal dose, route of administration and treatment duration. This is a particularly complex endeavor for phages, as standard assessments of clinical pharmacology used to determine the processes of Administration, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) of drugs are not adapted to phages. Indeed, phages massively replicate on their target bacteria with kinetic parameters governing this viral amplification (receptor recognition, genome amplification, particles assembly and bacterial lysis) being specific to each phage-bacteria pair (Dion et al., 2020). Furthermore, phages are naturally present in human-associated microbiotas and their rate and route of elimination do not follow usual metabolic pathways of xenobiotic products through kidney or liver (Dabrowska and Abedon, 2019).

Here we coupled *in vitro* and *in vivo* experiments with mathematical modeling to approach the key parameters of phage-bacteria-host interactions and guide treatment strategies. This approach has been successful in drug development for various chronic (HIV, HCV) and acute (Ebola, Zika, Influenza) viral infections (Friberg and Guedj, 2020; Perelson and Guedj, 2015). Unlike previous models that focused on specific aspects of phage-bacteria, phage-host immune system or bacteria-host immune system interactions (Cairns et al., 2009; Roach et al., 2017; Smith et al., 2011; Weld et al., 2004), here we aimed to design a synthetic, semi-mechanistic model that could be used to understand the tripartite phage-bacteria-host interactions *in vivo*. We purposely designed specific experiments (Figure 1) to estimate the key parameters of phage-bacteria interactions using a previously characterized experimental

model (Dufour et al., 2015). The virulent phage 536_P1 (141,471bp), a *Myoviridae* belonging to the *Phapecoctavirus* genus quickly (20 min) lyses the hypervirulent *Escherichia coli* strain 536 *in vitro*. Moreover, a single dose of phage 536_P1 administered intranasally to mice 2 h post-infection by a lethal dose of strain 536 rescued 100% of animals, while untreated animals died within 72 h, demonstrating the efficacy of this phage to treat an acute pulmonary infection (Dufour et al., 2015).

Here, dynamic and direct microbiological data were collected from groups of animals that were either (bacterial) uninfected and (phage) treated, infected and untreated, or infected and treated, using different inoculum doses and routes of administration. These data led us to develop an original mathematical model recapitulating the tripartite interactions over time. This model identified key parameters affecting bacterial kinetics *in vivo*. It was then exploited to test scenarios including variations of phage intrinsic properties. The use of such model will rationalize the phage choice, the dose and route of administration in order to optimize the efficacy of phage therapy.

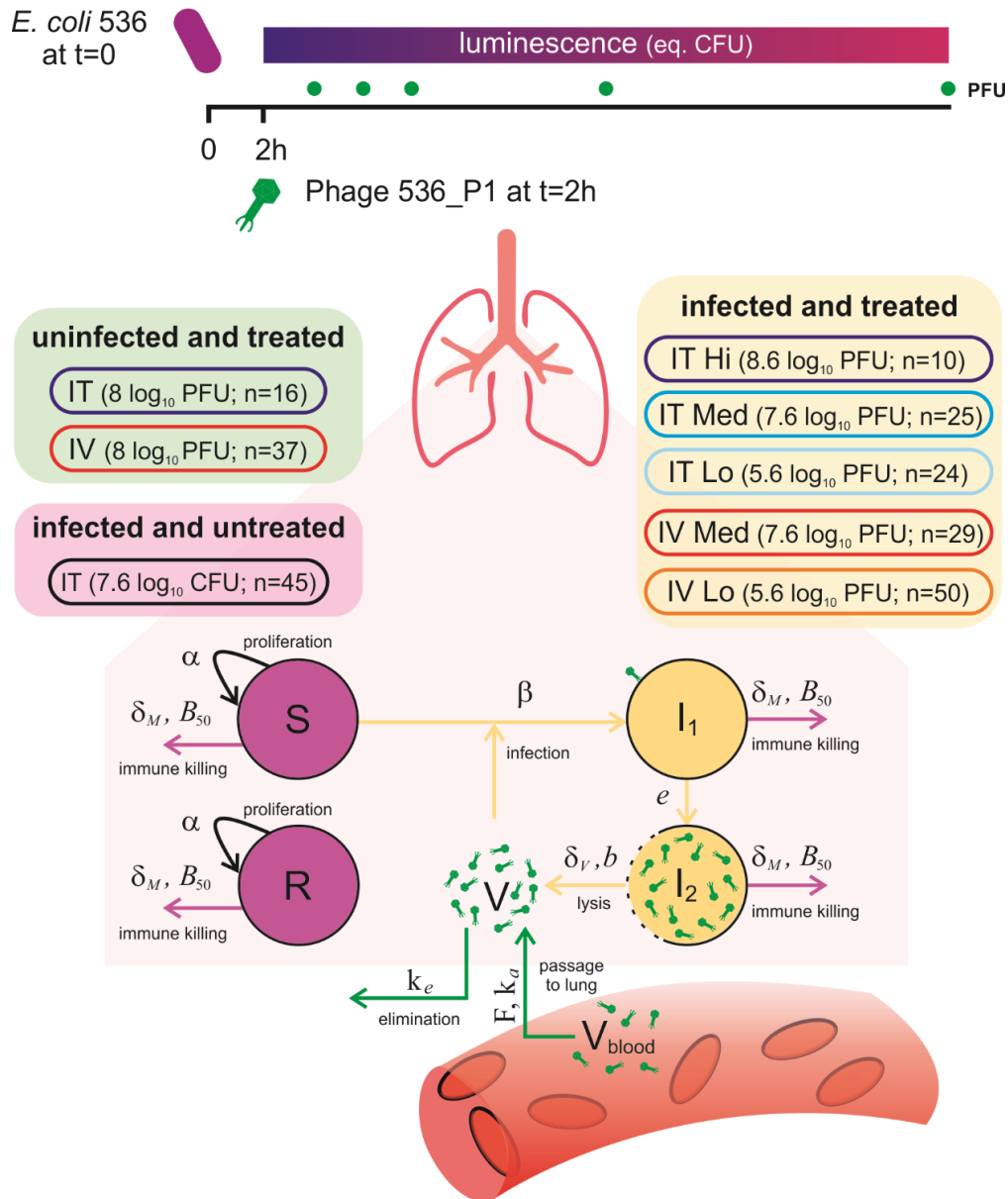


Figure 1. Schematic representation of the experimental design of the study.

In vivo experiments were conducted in mice that were either i) uninfected and treated (green box, with phages administered either intratracheally, IT, or intravenously, IV); ii) infected and untreated (magenta box); iii) infected and IT- or IV-treated at various doses (yellow box). The intensity of light emitted by *E. coli* strain 536-lux was recorded along all experiments and translated to bacterial lung density, while phage 536_P1 density was measured only once (upon sacrifice) in each animal at specific time points. A mathematical compartmental model was developed to fit to these data, with S, R, I₁ and I₂ representing the susceptible, refractory, infected non-productive, productively infected bacteria, respectively, and V and V_{blood} the phage concentration in lungs and blood, respectively. The arrows indicate the processes affecting each compartment. Model parameters characterizing these processes are indicated

on these arrows, with α the bacterial growth rate, δ_M the maximal immunity effect, B_{50} the bacterial load leading to 50% of δ_M , β the infectivity rate, e the transition rate from latent to productive bacteria, δ_V the bacterial lysis rate, b the burst size, F the phage relative bioavailability in the lungs after IV compared to IT, k_a the phage absorption rate from the blood to the lungs and k_e the phage elimination rate in the lungs.

RESULTS

A. Biodistribution of phage in uninfected mice

Our investigations started by assessing two routes of phage administration, intratracheal (IT) and intravenous (IV), in uninfected mice using a single dose of $8 \log_{10}$ PFU of phage 536_P1 (Figure 2). The observed peak of median [interquartile] phage concentrations in the lungs was reached four hours post administration by IV ($5.1 [4.7, 5.5] \log_{10}$ PFU/g) and was lower than concentration observed post administration by IT at the same time point ($7.2 [6.8, 7.8] \log_{10}$ PFU/g). The nearly 2-log difference showed that post IV administration only a fraction F of the phage, estimated to 0.02%, ultimately reached the lung compartment leading to exposure approximately 5000 times lower than post IT administration, and an estimation of the absorption rate into the lung compartment, k_a , of 0.3 h^{-1} (Eq. 1-2). During the 48 h post phage administration, the kinetics of phage elimination rate was slow following IT administration with an estimated half-life value of 12 h ($\log(2)/k_e(IT)$), while it was much faster following IV administration with an estimated value of 3 h (Table 1).

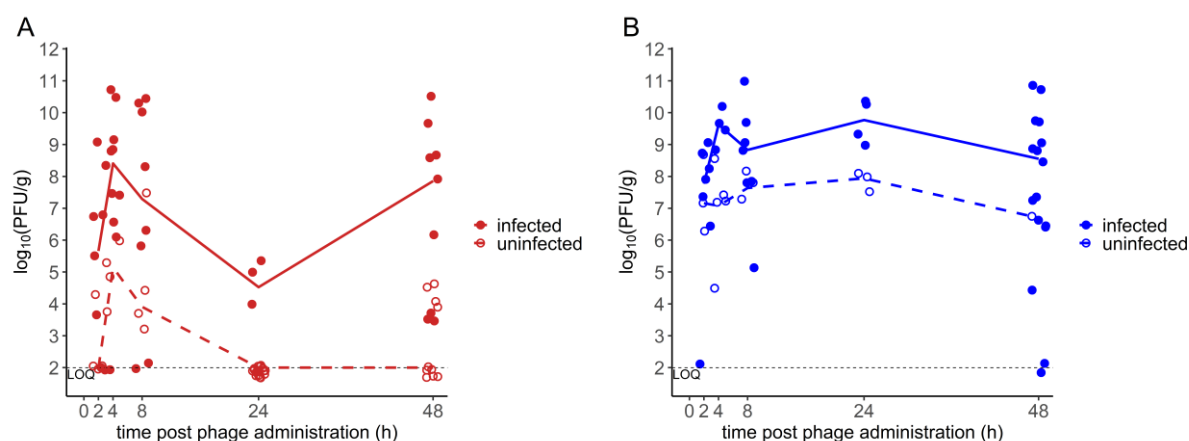


Figure 2. Distribution of phage 536_P1 in lungs following two routes of administration.

Lungs of uninfected (empty circles, N=53) and *E. coli* infected (filled circles, N=76) mice were homogenized at 2, 4, 8, 24 or 48 h post-administration of a single dose of phage 536_P1 (8 $\log_{10}$ PFU in uninfected mice and 5.6, 7.6, or 8.6 $\log_{10}$ PFU in infected mice), either by intravenous (A, red) or intratracheal (B, blue) route. Lines connect the median phage concentrations at each time point (dashed lines, uninfected; full lines, infected). The black dotted line represents the limit of quantification (LOQ=2 $\log_{10}$ PFU/g).

TABLE 1. PARAMETER ESTIMATES OF THE PHAGE-BACTERIA DYNAMICS MODEL

Parameter	Name	Unit	Fixed/Estimated from	Fixed effect (rse, %)	Sd of random effect (rse, %)
Bacterial growth rate	α	h^{-1}	Untreated infected	0.21 (-)	0 (-)
Initial number of bacteria	B_0	$\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Untreated infected	7.1 (1)	0.14 (6)
Bacterial load plateau	B_{max}	$\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Untreated infected	10.4 (-)	0 (-)
Time for immunity activation	t_I	h	Untreated infected	3.0 (-)	0 (-)
Maximal immunity effect	δ_M	$\text{CFU g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Untreated infected	$6.7 \cdot 10^6$ (-)	0.05 (-)
Bacterial load for 50% of δ_M	B_{50}	CFU g^{-1}	Untreated infected	$2.3 \cdot 10^7$ (-)	0 (-)
Infectivity rate	β	$\log_{10} \text{g CFU}^{-1} \text{h}^{-1}$	Treated infected	-6.9 (7)	0.11 (43)
Transition rate	e	h^{-1}	<i>in vitro</i>	1.2 (-)	0 (-)
Lysis rate	δ_V	h^{-1}	Treated infected	0.09 (25)	0 (-)
Burst size	b	PFU CFU^{-1}	<i>in vitro</i>	570 (-)	0 (-)
Relative bioavailability (IV/IT)	F	-	Treated uninfected	0.0002 (-)	0 (-)
Phage absorption rate	k_a	h^{-1}	Treated uninfected	0.3 (-)	0 (-)
Phage elimination rate after IT	$k_e(IT)$	h^{-1}	Treated uninfected	0.058 (-)	0 (-)
Phage elimination rate after IV	$k_e(IV)$	h^{-1}	Treated uninfected	0.23 (-)	0 (-)
Phage distribution weight	W	g	Treated uninfected	1 (-)	0 (-)
Initial refractory proportion	f	-	Treated infected	0.105 (45)	2.8 (19)
Weibull shape	κ	-	Treated infected	1.8 (11)	0 (-)
Weibull scale	λ	h^{-1}	Treated infected	$2.4 \cdot 10^4$ (98)	0 (-)
Impact of bacterial kinetics on death	γ	g CFU^{-1}	Treated infected	1.44 (13)	0 (-)
Additive error on bacterial load	σ_B	$\log_{10} \text{CFU g}^{-1}$	Treated infected	-	0.47 (4)
Additive error on phage concentration	σ_V	$\log_{10} \text{PFU g}^{-1}$	Treated infected	-	2.6 (11)

Sd: standard deviation, rse: relative standard error

B. Bacterial kinetics in infected-untreated mice

IT administration of the E. coli strain 536 led to a large variability in the lung bacterial load of untreated animals (N=45), as measured by emitted luminescence and CFUeq/g (see methods and Supplementary Figure S1). Two hours post infection, bacterial load ranged between 5.0 and 9.9 $\log_{10}$ CFUeq/g (Figure 3), allowing us to evaluate the impact of phage across the large spectrum of values that can be observed in clinical conditions (Jiang et al., 2014). The large

range of effective inoculums also informed on the threshold of bacterial density above which the immune response of the host cannot control the infection. When the bacterial load was greater than 6.8 log₁₀ CFUeq/g at two hours post-infection, the bacterial density increased continuously and led to rapid death of all animals within 72 hours. In opposite, below this threshold, a reduction of the bacterial density was generally observed, likely reflecting the effect of the immune response in clearing the infection (Figure 3 and Supplementary Figure S2).

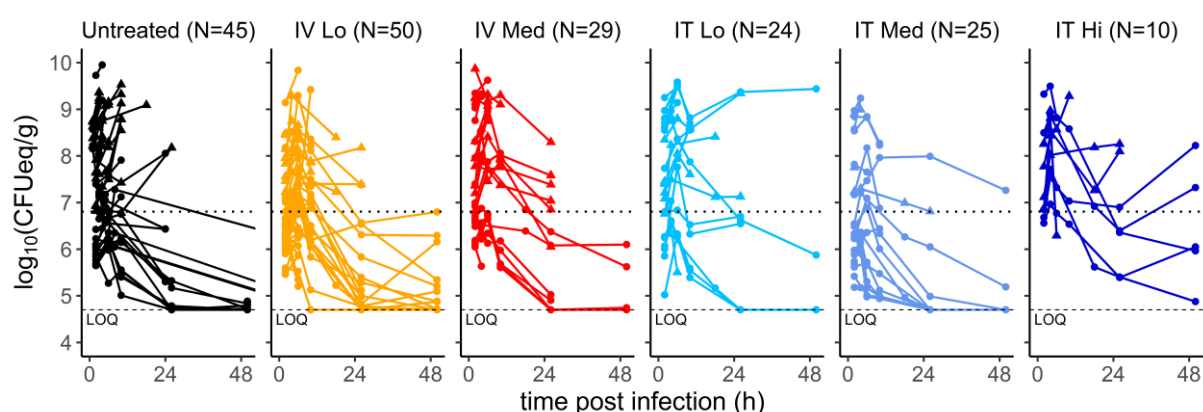


Figure 3. Kinetics of bacterial densities in untreated and phage-treated animals.

CFU equivalent data from bioluminescent recordings of infected animals, which were either untreated (black) or treated with phage 536_P1 administered by IV (low dose=5.6 log₁₀ PFU, yellow; or medium dose=7.6 log₁₀ PFU, red) or IT (low dose, cyan, or medium dose, blue or high dose=8.6 log₁₀ PFU, dark blue). The dotted horizontal line at 6.8 log₁₀ CFUeq/g corresponds to the threshold value of bacterial load at two hours post-infection below which all animals controlled the infection. The dashed line represents the limit of quantification of bacterial load (LOQ=4.7 log₁₀ CFUeq/g).

C. Bacterial and phage kinetics in infected treated mice

Next, using the same infection procedure as above, mice (N=138) were treated two hours post-infection with various doses of phage 536_P1 (low dose: 5.6; medium dose: 6.6; high dose: 7.6 log₁₀ PFU), administered either by IT or IV route. The initial effective median bacterial inoculum in the lungs two hours post-infection was similar across treatment groups, with

levels of 6.9 [6.1, 8.0], 7.2 [6.3, 8.5] and 6.7 [6.3, 7.8] $\log_{10}$ CFUeq/g in untreated, IT- and IV-treated animals, respectively (Figure 3).

Globally, phages density in the lungs of IT- and IV-treated animals reached values 2 to 3- $\log_{10}$ higher than in uninfected animals, showing that phages rapidly encountered bacteria and efficiently replicated (Figure 2). At four hours post-phage administration (six hours post-bacterial infection), the median titer of phage in the lungs of IT-treated mice (N=59) was 9.6 [9.3, 9.9] $\log_{10}$ PFU/g, as compared to 7.1 [7.1, 7.4] $\log_{10}$ PFU/g in uninfected IT-treated mice (N=16). A similar difference was also observed in IV-treated animals (N=79), with phages concentration of 8.4 [7.0, 9.1] $\log_{10}$ PFU/g as compared to 5.1 [4.7, 5.5] $\log_{10}$ PFU/g in uninfected IV-treated animals (N=37) (Figure 2).

D. Unraveling bacteria-phage interaction using a mathematical model

Next, we used the data from both infected and uninfected animals together with parameters determined *in vitro* (see methods) to build a mathematical model of phage-bacteria-host interaction (Eq. 4-10, Figure 1).

Fitting the model to bacterial load data, we first determined that a model accounting for the control of bacterial growth by the innate immune response was needed to recapitulate the threshold effect associated with the effective bacterial inoculum. This phenomenon could be well captured using our model (Eq. 3), with estimates of δ_M , the maximal decay induced by the immune response, of 6.8 $\log_{10}$ CFUeq/g/h and B_{50} , the bacterial load needed to reach $\delta_M/2$, of 7.4 $\log_{10}$ CFUeq/g. This corresponds to a threshold for bacterial control equal to 6.94 $\log_{10}$ CFUeq/g. Thus, if the administered bacterial inoculum, B_0 , was below this value, bacteria were rapidly eliminated by the immune system with a rate $\sim \delta_M/B_{50} = 0.3 \text{ h}^{-1}$, corresponding to a half-life of 2.3 hours. However, when the bacterial inoculum was above this value, the model predicts a saturation of the immune response, enabling bacterial growth with a bacterium doubling time estimated at 3.5 hours.

In vitro experiments allowed us to estimate two key parameters of phage dynamics that could not be identified *in vivo*, namely the median eclipse phase and the burst size (see methods and Supplementary Figure S3). Assuming that these parameters had the same value *in vivo*,

we could then estimate the *in vivo* infection rate of bacteria by phages, noted β , to $-6.9 \log_{10} \text{g/CFU/h}$, and the *in vivo* elimination rate of phage-infected bacteria, δ_V , to 0.09 h^{-1} (eg, a half-life of 7.7 h).

Finally, we also used the model to assess the impact of bacterial kinetics on survival. Assuming a log-linear effect of bacterial load on the instantaneous risk of death, $h(t)$, the bacterial load was found to be highly associated with death ($\gamma=1.44$, $p<10^{-3}$, Wald test). This corresponds to a hazard ratio of 4.2; in other words, an increase of 2 log of the bacterial load raised the instantaneous risk of death by ~ 18 . The joint model developed could simultaneously recapitulate bacterial kinetics, phage counts and survival rate (Figure 4, Supplementary Figures S4 and S5), despite the heterogeneity of the individual profiles experimentally observed (Figure 4 and Supplementary Figure S2).

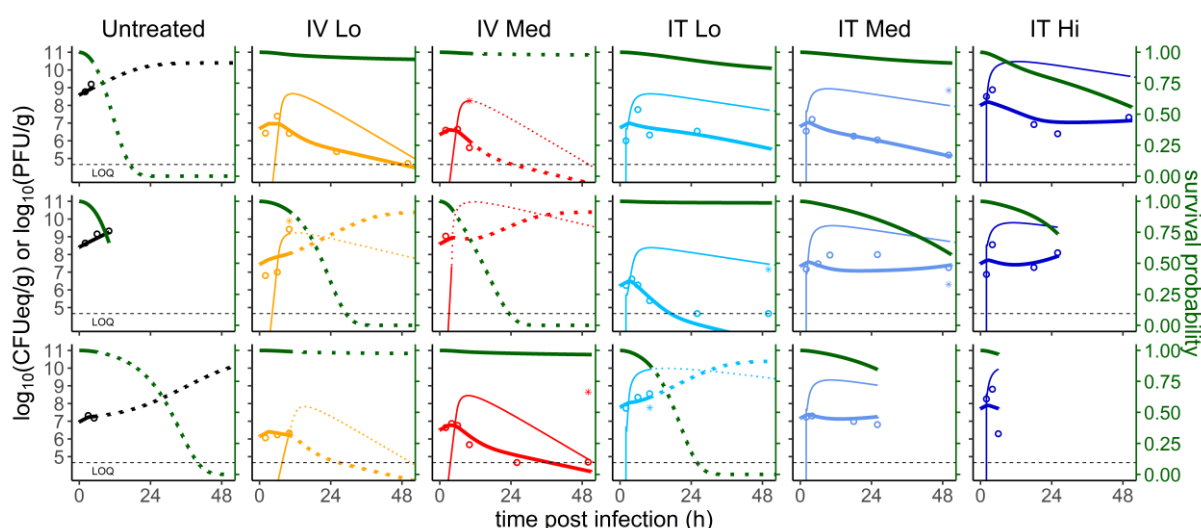


Figure 4. The mathematical model recapitulates the individual variations of the pulmonary bacterial loads and estimates the survival of infected animals.

Data and model predictions for three mice (lines) randomly chosen from each experimental groups (columns) are shown. The circles correspond to the pulmonary bacterial loads, the color lines correspond to the individual predictions from the model, and the green line represents the predicted survival probability. Lines are solid between $t=0$ and the last observation time point (death or pre-specified sacrifice) and are dotted after the pre-specified sacrifice. Interrupted lines indicate the death of animals before the pre-specified time point. The horizontal dashed line represents the limit of quantification ($\text{LOQ}=4.7 \log_{10} \text{CFUeq/g}$).

E. Effects of phage dose and route of administration on the bacterial kinetics

The model was then used to identify the key factors governing bacterial kinetics. Unsurprisingly, the bacterial inoculum, B_0 , was the most important parameter. In animals with $B_0 < 6 \log_{10}$ CFUeq/g, bacterial loads rapidly decreased below the limit of quantification within 48 h, regardless of treatment. In animals with large bacterial inoculum $B_0 > 8 \log_{10}$ CFUeq/g, phage therapy was not sufficient to control the continuous growth of bacteria, regardless of the route and administered phage dose (Figure 5). The benefit of phage therapy was apparent mostly for animals having an intermediate effective inoculum size, e.g. $6 < B_0 < 8 \log_{10}$ CFUeq/g. In those animals, the larger ratio of phage to bacteria led to a large number of bacteria being rapidly infected by phages, which prevented bacterial growth and maintain the bacterial load under control by the immune response. Bacterial load decline was biphasic, with a rapid decline in the first four hours of treatment, mainly due to the decay of susceptible bacteria (S) by phages, followed by a slower decline afterwards. This slower second phase was attributed in our model to the unrestricted replication of a sub-population of bacteria that were not eliminated by phages (V), representing both phage-resistant and phage-inaccessible (spatially out of reach) bacteria (R).

The initial proportion of the phage-refractory population was estimated to 10% (Table 1), but could be variable across individuals (from 0.03% to 76%). The dynamics of refractory bacteria was individual dependent, leading either to a slow but continuous bacterial decline or to a rebound of fully refractory bacteria within 24-48 hours (see individual examples in Figure 4). Importantly, the need to incorporate a compartment of refractory bacteria in the model was strongly supported by the data and led to a significant improvement of the data fitting ($p < 10^{-3}$, Likelihood Ratio Test, not shown).

The raw data did not allow to observe a role of the route of administration in the treatment outcome, except with a low bacterial inoculum ($B_0 = 6 \log_{10}$ CFUeq/g) for which the rapid clearance of bacteria limited the encounter rate with phage. With this inoculum, relatively to the kinetics in the untreated group, simulations indicated that an IT or IV medium dose of phages halved the total bacterial load in 3.1 and 8.1 h after administration, respectively. Our simulations also indicated that IT and IV treatments otherwise led to similarly high phages

concentrations ($>7 \log_{10}$ PFU/g) in lungs (Figure 5). IT administration was however associated with a substantially faster time to peak viral load, and this difference was particularly apparent with a low or an intermediate bacterial inoculum. For instance, with an intermediate bacterial inoculum ($B_0 = 7 \log_{10}$ CFUeq/g), the time to peak viral load varied between 1.6 h (IT high dose) and 6.0 h (IV low dose). As a consequence of this delay in phage maximal replication, IV route had a lower efficiency to stop bacterial growth, with a time to peak bacterial load that could be as long as 4.0 h (IV low dose), to less than 1.1 h with IT route (IT low dose), and as low as 0.3 h in the case of IT high dose. Overall, with this lethal intermediate inoculum the bacteria grew exponentially in untreated mice whereas the bacterial load declined in all phage-treated groups. Therefore, in any phage-treated group, the median total bacterial load was increasingly lower than that of the untreated group. For instance, 24 h after administration, the bacterial load in treated groups was more than 100 times lower than in the untreated group (Figure 5).

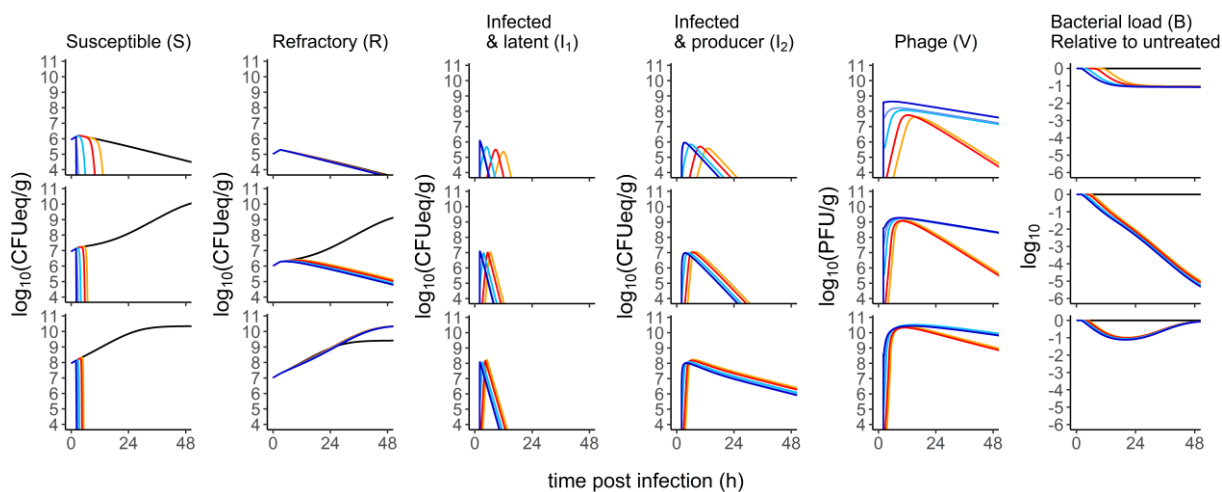


Figure 5. Simulations of different bacterial inoculums inform on the impact of refractory bacteria. Median profile assuming initial bacterial inoculums of 6, 7 and $8 \log_{10}$ CFUeq/g (top, middle and bottom lines, respectively). Predictions were calculated for each bacterial population (S, R, I_1 and I_2) and phages (V). The last column represents the ratio of the total bacterial load ($B = S + R + I_1 + I_2$) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route and the dose of phage administered: untreated (black),

IV-Lo (5.6 log₁₀ PFU, orange), IV-Med (7.6 log₁₀ PFU, red), IT-Lo (cyan), IT-med (blue), IT-high (8.6 log₁₀ PFU , dark blue).

F. Effects of phage characteristics on the bacterial kinetics

Finally, we also used the model to explore the effect of intrinsic phage characteristics, namely burst size and lysis rate, on the bacterial kinetics. A 10-fold reduction in burst size (*i.e.* 57 PFU/CFU) predicted a larger impact of the route of administration, with a time to bacterial peak of 10 h post-IV compared to less than 3 h post-IT administration. Even when using a low dose of phage, the time to bacterial peak relative to untreated bacterial load was estimated at 12 h post IT compared to 20 h post IV (Supplementary Figure S6). However, a higher lysis rate value counter-balanced the effects of a low burst size value (Supplementary Figure S7), showing the sensitivity of the model to phage characteristics.

DISCUSSION

Despite many encouraging data from both ancient literature and recent compassionate treatments, phage therapy remains underexploited, notably because of ambiguous results from clinical trials (Luong et al., 2020). In fact, the translation from *in vitro* to clinical conditions remains unmet, in particular since using phages as a drug requires specific methods to elaborate a rational scheme for a safe and optimal administration. While some studies performed *in silico* or in laboratory conditions (Cairns et al., 2009; Kasman et al., 2002; Leung and Weitz, 2017; Payne and Jansen, 2001, 2003) led to propose several mathematical models of phage-bacteria interactions, very few studies conducted *in vivo* incorporated the immune response (Dabrowska and Abedon, 2019; Roach et al., 2017).

Our experimental approach was inspired from the work performed during the development of new drugs, where intensive pharmacokinetic and pharmacodynamics data are required to optimize the dosing regimens of a treatment (Marshall et al., 2019). Here, we collected an unprecedented biological set of data using an *in vivo* imaging tool to longitudinally follow the same animals over time and from which we developed a semi-mechanistic model to characterize the dynamics of a phage treatment.

The acute murine lung infection induced by bacterial pathogens that we used for this study imposed two constraints. First, less than 1-log variation of the bacterial inoculum can lead to contrasted outputs from rapid (24 h) mortality to no lethality (our and colleagues unpublished observations with various strains of *E. coli* or *Pseudomonas aeruginosa* for which preliminary experiments were performed to identify the most appropriate bacterial inoculum). Second, the high pathogenicity of pathogens necessitated a phage administration two hours post-infection to preserve a high survival rate of treated animals (Debarbieux et al. 2010). It is worth noting that until the early 2000s, Enterobacteriaceae were not considered as major pathogens responsible for ventilator-assisted pneumonia (Chastre and Fagon, 2002). However, recent data have consistently shown that *Enterobacteriaceae* are now frequent etiologic agents of ventilator-assisted pneumonia, more frequently encountered than *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Fihman et al., 2015; Hamet et al., 2012; Kollef et al., 2017). In

particular, several studies have clearly identified specific traits of strains of *E. coli* responsible for ICU-acquired pneumonia (La Combe et al., 2019; Messika et al., 2012).

The heterogeneity of the initial bacterial loads observed two hours post-infection provided a large range of situations reflecting clinical situations (Jiang et al., 2014). The variety of individual profiles was captured by using non-linear mixed effect models to estimate phage/bacterial interaction, a statistical approach that borrows strength from the between-subjects variability to increase the precision of parameter estimation, and tease out the effects of bacteria parameters, doses and routes of administration. A direct consequence of the above conditions was the precise quantification of the threshold value ($6.94 \log_{10}$ CFUeq/g) above which the immune response was overwhelmed.

The modeling of phage-bacteria interactions in the host also unraveled less evident factors, such as the role of a refractory bacterial population to capture bacterial load kinetics. This compartment could not be phenotypically characterized but encompasses bacteria that are escaping phage predation because they are phage-resistant and/or they remain spatially inaccessible to phages (Leung and Weitz, 2017; Lourenco et al., 2020; Sousa and Rocha, 2019). The inclusion of this compartment is supported by both the emergence of phage resistance observed *in vitro* after 10 h of incubation with phage 536_P1 (Supplementary Figure S4), and previous studies showing that the spatial distribution of bacteria in organs make some of them inaccessible to phages (Lourenco et al., 2020; Sousa and Rocha, 2019). This was also in agreement with the modelling of phage therapy in immunocompromised hosts (Roach et al., 2017). Despite the large variation of the bacterial loads that directly affects the initial density of this refractory population, our model could appropriately recapitulate the kinetics of phage-bacteria interactions for each individual mouse, including the survival probability, testifying of its robustness. In addition, simulations performed with larger or lower burst sizes and lysis rates, showed that the model predicts outputs that are in agreement with results from animal studies in which different phages were used to treat bacterial infections (Alemayehu et al., 2012; Carmody et al., 2010; Henry et al., 2013; Morello et al., 2011).

To ensure that the model recapitulates kinetics of phage-bacteria interactions during therapy, it was necessary to use as much as possible parameters deduced from animal experiments instead of *in vitro* conditions. For instance, growth rate of bacteria, infectivity rate and lysis rate, were all deduced from experimental data. Nevertheless, some parameters should be more deeply investigated to improve the fidelity of the model. For instance, growth of refractory population was approximated as similar to the susceptible bacteria, neglecting the possibility that the fitness of mutants might be affected in the host. Indeed, such mutants could be, either or both, less virulent and strongly affected in their growth, allowing immune cells to eliminate them more effectively (Oechslin et al., 2017; Pouillot et al., 2012; Smith et al., 1987). The involvement of the immune response in the success of respiratory phage therapy was previously demonstrated and modelled, but remains mechanistically poorly explored (Roach et al., 2017). In this work we chose to account for the immune response in a synthetic way which encompasses mechanical factors, such as mucins and surfactant proteins, as well as various cellular actors of the innate immune system (Bergeron et al., 1998; Levin et al., 2017; Marriott and Dockrell, 2007). However, the immune response would have been more mechanistically characterized if several markers (cytokines, immune cells) had been monitored. Our model also considers the lung compartment as homogeneous, which ignores the complex structure of this organ that will most likely affect phage-bacteria interactions.

Predictions from the mathematical model showed the importance of viral load, burst size and lysis rate to fully capture bacterial kinetics and animal outcome. Therefore, for a suboptimal couple phage-bacteria, which may often take place in clinics, the administration route, and to a lesser degree the dose, will play a role in the rate at which bacterial growth will be controlled. This supports the determination of key parameters of phage-bacteria interactions, such as the infectivity rate and the lysis rate, for optimizing the phage administration scheme. However, when the dose and route of administration are appropriately chosen, the model predicted that substantial variations of the intrinsic characteristics of phages (burst size and lysis rate) were not jeopardizing the treatment outcome, which fits with the current semi-empirical choice of phages for compassionate treatments. Indeed, currently phages are chosen exclusively for their capacity to infect bacteria on *in vitro* conditions where phage-bacteria interactions are artificially optimized. To further evaluate the model, we performed simulations (external visual predictive check) from previous data obtained several years apart

with the same phage-bacteria couple (Dufour et al., 2015). Despite a different route of administration (intranasal) for both the bacteria and the phage we found that the model predicted acceptable results compared to the *in vivo* data, which argues in favor of its robustness and its putative relevance for many other phages (Supplementary Figure S8).

To conclude, the model developed during this work could be used to predict the efficacy of virtually any phage for which a minimum set of *in vitro* and *in vivo* data must be obtained, which will considerably lower the number of experiments needed to validate such a phage during pre-clinical development. Beyond phage therapy, the model could also be implemented to test combined anti-infectious therapies such as the association of phages with antibiotics (Lin et al., 2020).

METHODS

A. Determination of *in vitro* infection parameters of phage 536_P1

Parameters of the interactions between strain 536 and phage 536_P1 have been determined *in vitro*, notably the rate of transition e from infected non-productive bacteria to productively infected bacteria (eg, $\log(2)/e$ is the median eclipse phase duration), and the burst size b , *i.e.* the number of virions released by a lysed bacteria. The median eclipse phase time and the burst size were estimated from non-linear mixed effect models performed with the SAEM algorithm implemented in Monolix software (version 2018R2) (Kuhn and Lavielle, 2005) using data from one-step-growth experiments (see Supplementary material).

B. Presentation of the murine model of pulmonary phage therapy

The *E. coli* strain 536 is a virulent clinical strain belonging to the B2 phylogenetic group (Brzuszkiewicz et al., 2006). The *E. coli* strain 536-lux was obtained by the transformation of wild-type 536 strain with plasmid pCM17, which carries the *luxCDABE* operon from

Photorhabdus luminescens under *OmpC* promoter (Morin and Kaper, 2009). This plasmid is stable over 7 days without adding antibiotic in the medium (Dufour et al., 2015).

Phage 536_P1 (Dufour et al., 2015) is a virulent *Myoviridae* (149.4 Kb) that was amplified on strain 536 and purified according to molecular biology protocols including an endotoxin removal step (Endotrap Blue, Hyglos, Germany). The stock solution of $8.2 \log_{10}$ PFU/mL has an endotoxin concentration of 2.15 EU/mL.

Pneumonia was induced by intratracheal (IT) administration of strain 536-lux in eight-week-old BALB/cJRj anesthetized male mice (mixture of Ketamine and Xylazine administered intraperitoneally, IP). Exponentially growing bacteria in Luria Bertani Broth (Lennox) at 37°C were centrifuged and washed twice and finally resuspended in PBS to obtain inoculums ranging from 7.6 to $8.2 \log_{10}$ CFU in 20µL. Previous work showed that a single intranasal dose of $7.6 \log_{10}$ CFU led to a fatal outcome at 72 h post-infection for 100% of mice. Moreover, mice similarly infected were successfully treated (100% survival 10 days post-infection) when a single intranasal dose of $7.0 \log_{10}$ PFU of phage 536_P1 was administered 2 h post-infection (Dufour et al., 2015).

Phage treatment was applied under general anesthesia (isoflurane, inspired fraction=2%) using IT or intravenous (IV, retro-orbital injection) administration two hours after infection. A volume of 20µL of phage 536_P1 was used, containing either a low (Lo; $6.6 \log_{10}$ PFU), medium (Me; $7.6 \log_{10}$ PFU) or high (Hi; $8.6 \log_{10}$ PFU) amount of phages.

At 2, 4, 8, 24 and 48h after phage administration, mice were sacrificed, and blood (in heparin coated tubes) and lungs were recovered and put on ice. Lungs were weighted, homogenized in PBS with protease inhibitor (EDTA free micro Tabs, SigmaAldrich). Lungs and blood were then centrifuged (5000g, 15 min, 4°C). The supernatant was collected, serially diluted and spotted (in triplicate) on agar plates covered with strain 536 to titer phage 536_P1.

C. Bioluminescence and longitudinal follow up of bacterial load in lungs

In all our experiments photon emission of the luminescent bacteria was recorded at regular intervals under general anesthesia (isoflurane, inspired fraction=2%) using IVIS Spectrum and analyzed with Living Image software (PerkinElmer, Richmond, CA) as previously described

(Debarbieux et al., 2010). Photons emitted within the chest area of each mouse were collected as photon/s/cm²/steradian.

To fully exploit the *in vivo* imaging tool we established the correlation between bioluminescence and CFU count in lungs using data from 17 untreated animals that were euthanized at different time points and for which lung bacteria was quantified by plating (Supplementary Figure S1). The relationship obtained allowed us to derive from the luminescence signal an equivalent counts of CFU per gram of lung (noted CFUeq/g) that was used to obtain in all infected animals (untreated or treated by phages) the bacterial densities.

D. Phage distribution

A dose of 8 log₁₀ PFU of phage 536_P1 was administered in uninfected mice (N=53) using IT (N=16) or IV (N=37) route. At 2, 4, 8, 24 and 48h after phage administration, mice were sacrificed, and blood (in heparin coated tubes) and lungs were recovered and put on ice. Lungs were weighted, homogenized in PBS with protease inhibitor (EDTA free micro Tabs, SigmaAldrich). Lungs and blood were then centrifuged (5000g, 15 min, 4°C). The supernatant was collected, serially diluted and spotted (in triplicate) on agar plates covered with strain 536 to titer phage 536_P1.

We used the following standard pharmacokinetic model to estimate phage biodistribution:

$$\frac{dV_B}{dt} = -k_a V_B \quad (1)$$

$$\frac{dV}{dt} = Fk_a V_B - k_e V \quad (2)$$

Where V and V_B denote phage quantity in lung and blood compartments, respectively, k_e is the elimination rate from lungs, k_a is the transfer rate from blood to lungs, F is the bioavailability in lungs after IV administration. The initial condition of these equations are $V_B(0) = dose$ and $V(0) = 0$ in case of IV administration and $V_B(0) = 0$ and $V(0) = dose$ in case of IT administration. V is divided by the phage distribution weight (W) to obtain the phage

concentration in lung compartment. Before the modelling analysis, the median phage concentration at baseline ($8 \log_{10}$ PFU/g) was determined following the IT administration of a single dose of $8 \log_{10}$ PFU, and F was obtained by performing the ratio of IV/IT area under the curves in the lungs. The parameter W was deduced from the phage concentration at baseline. Estimations of the other parameters were performed by naïve pooling of data (i.e. considering all the measures for each group (IV and IT) as if they came from a single individual and performing a nonlinear regression).

E. Bacterial kinetics in untreated mice

We characterize the natural bacterial kinetics (i.e., in absence of treatment) in animals infected with doses of $7.6 \log_{10}$ CFU (34 mice) or $8.2 \log_{10}$ CFU (12 mice) and the bacterial kinetics obtained by bioluminescence (see above) using the following model (one mouse was not analyzed due to death during bacterial inoculation, i.e. $N=45$):

$$\frac{dB}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{B}{B_{max}} \right) B - \delta_M \frac{B}{B_{50} + B} \quad (3)$$

Where α is the exponential growth rate of bacteria (eg, $\log(2)/\alpha$ is the doubling time) and B_{max} is the maximal carrying capacity, determined by sensitivity analysis. The initial condition of B was estimated by the parameter B_0 ($B(0) = 10^{B_0}$). Consistent with previous work (Dufour et al., 2019), we assumed that in the first 3 hours of infection the immune system had no activity (eg, bacteria could grow exponentially during this period). After this period the elimination of bacteria by the host was modeled by a non-linear saturable term, given by $\delta_M \frac{B}{B_{50} + B}$. The model parameters were estimated in non-linear mixed effect models performed with the SAEM algorithm implemented in Monolix software (version 2018R2) (Kuhn and Lavielle, 2005).

F. Phage-bacteria interaction in treated mice

We characterized phage/bacterial interactions using data obtained in 142 mice infected by $7.6 \log_{10}$ CFU and treated subsequently (four mice were not analyzed due to death during bacterial inoculation, i.e. $N=138$), using the protocol described above, with a single dose (low,

medium or high) of phages administered using IT or IV route (detail of the groups in Figure 1). Bacterial kinetics was derived from bioluminescence (see above) and lungs were collected at 2, 4, 8, 24 or 48h after phage administration to count PFU. We also considered data in untreated mice (see previous section) for the analysis.

The model describing interactions between phage 536_P1 and strain 536 relied on a system of ordinary differential equations (ODE) (Figure 1, Equations 4 to 10, presented below). We combined standard model of viral (Perelson and Guedj, 2015) and bacterial kinetics (Friberg and Guedj, 2020) to tease out the main parameters governing phage-bacteria interaction in mice. In lungs, phages can infect susceptible bacteria (S) following a mass-action term, with rate β . We also considered a population of refractory bacteria (of initial proportion f), noted R, that includes both phage-resistant and phage-inaccessible bacteria.

$$\frac{dS}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{B_{max}} \right) S - \delta_M \frac{S}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} - \beta VS \quad (4)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \beta VS - eI_1 - \delta_M \frac{I_1}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (5)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = eI_1 - \delta_V I_2 - \delta_M \frac{I_2}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (6)$$

$$\frac{dR}{dt} = \alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{B_{max}} \right) R - \delta_M \frac{R}{B_{50} + S + I_1 + I_2 + R} \quad (7)$$

$$\frac{dV_B}{dt} = -k_a V_B \quad (8)$$

$$\frac{dV}{dt} = -\beta VS + b\delta_V I_2 + Fk_a V_B - k_e V \quad (9)$$

We considered the following initial condition for this system: $S(0) = 10^{B_0}(1 - f)$, $I_1(0) = 0$, $I_2(0) = 0$, $R(0) = 10^{B_0} \times f$, $V_B(0) = 0$, $V(0) = 0$. The dose of phages is added to V or V_B at the phage administration time by IT or IV route, respectively.

The model parameters in bold were estimated in non-linear mixed effect models performed with the SAEM algorithm implemented in Monolix software using data from all infected animals (version 2018R2) (Kuhn and Lavielle, 2005). All other parameters were fixed to the values determined above, either *in vitro* (e, b), in uninfected treated mice (k_a, F, k_e) or in infected untreated mice ($\alpha, B_{max}, \delta_M, B_{50}$).

G. Impact of bacterial kinetics on survival

Finally, we aimed to take into account the potential bias due to the fact that more severely infected animals died earlier, making the population study less and less representative as time goes by. In this approach, called joint models (Desmées et al., 2015), the probability to survive up to time t , $S(t)$, is modeled as: $S(t) = e^{-\int_0^t h(t)dt}$ where

$$h(t) = \frac{\kappa}{\lambda} \left(\frac{t}{\lambda} \right)^{\kappa-1} e^{\gamma \times \log(S(t)+I_1(t)+I_2(t)+R(t))} \quad (10)$$

$h(t)$ is the instantaneous hazard function, κ and λ are scale parameters characterizing the risk of death in absence of infection and γ quantifies the impact of bacterial load on mortality. Thus, in this model $\gamma = 0$ is indicative of an absence of association between bacterial load and mortality, while $\gamma > 0$ indicates that increased bacterial load is associated with an increased risk of death.

H. Model evaluation

Individual fits were investigated to evaluate the different models. For the final model, we also evaluated the model predictions i) for the bacterial kinetics by using prediction corrected-visual predictive checks (Bergstrand et al., 2011), accounting for the risk of death and ii) visual predictive checks of the survival. Simulations for validation methods were made using mlxR package.

I. Model based simulations for the impact of treatment procedures and phage parameter values

Model based predictions were performed to investigate various scenarios as follows. For each simulation, the median profile of different model compartments (S, R, I_1, I_2 and V) was investigated using the parameters determined in Table 1 and different experimental conditions regarding the route of administration (IV or IT), the dose of phage administered (Lo: 5.6, Med: 7.6 or Hi: 8.6 $\log_{10}$ PFU) and initial bacterial load (6, 7 or 8 $\log_{10}$ CFUeq/g). We also evaluated the effects of different burst size (10 fold lower, 10 fold larger than the estimated value *in vitro*), using a single initial bacterial load of 7 $\log_{10}$ CFUeq/g. Furthermore, when setting a burst size 10 times lower than the estimated value (and a fixed initial bacterial load of 7 $\log_{10}$ CFUeq/g), we investigated the effect of three different lysis rates values: the value estimated *in vivo* (0.09 h^{-1}); a value three times higher (0.27 h^{-1}); a value estimated *in vitro* (1.39 h^{-1}).

J. Ethic statement

A total of 241 eight-week-old BALB/cJRj male mice (Janvier, France) were housed in animal facility in accordance with French and European regulations on the care and protection of laboratory animals. Food and drink were provided ad libitum. Protocol was approved by the veterinary staff of the Institut Pasteur animal facility (approval number 20.173) and the National Ethics Committee regulating animal experimentation (APAFIS#26874-2020081309052574 v1).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé). BG received support from AIHP (Amicale des Anciens Internes des Hôpitaux de Paris). RD and ND received both independently support from Poste d'Accueil APHP/IP. We thank Hervé Le Nagard and Lionel de la Tribouille for the use of the CATIBioMed calculus facility.

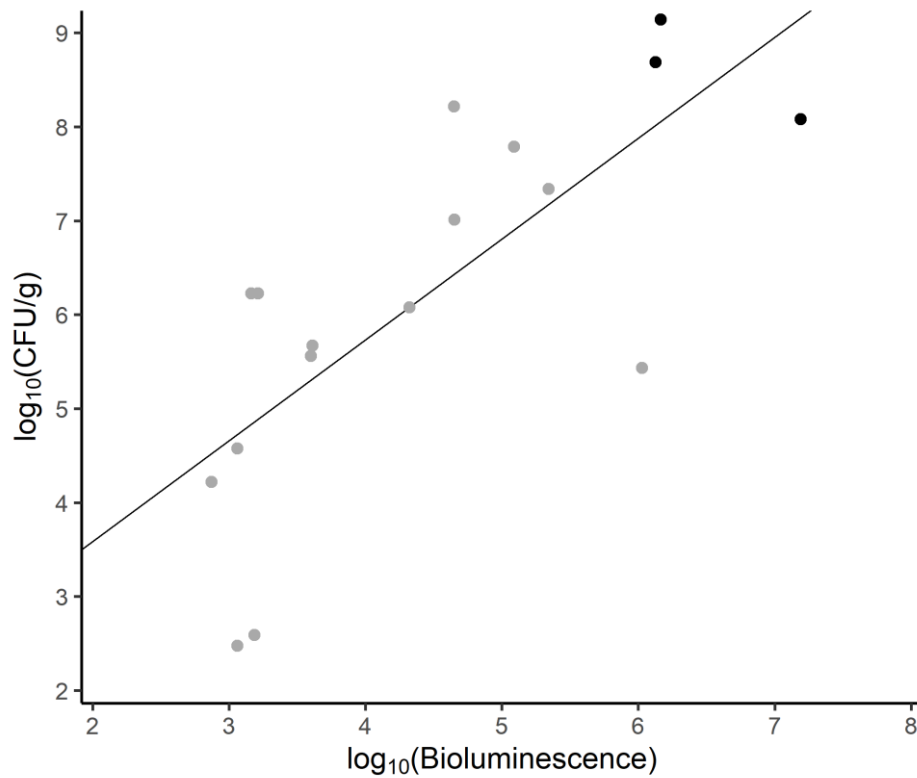
AUTHORS CONTRIBUTION

JDR, JG, LD and RD, conceived the study and secured funding. BG, FH, RD and RK performed experiments. JDR, JG, JS, LD and RD analyzed the data. JG, JS and TTN performed modeling. ND provided feedback. JS and RD wrote the first draft. JG and LD reviewed and edited final draft.

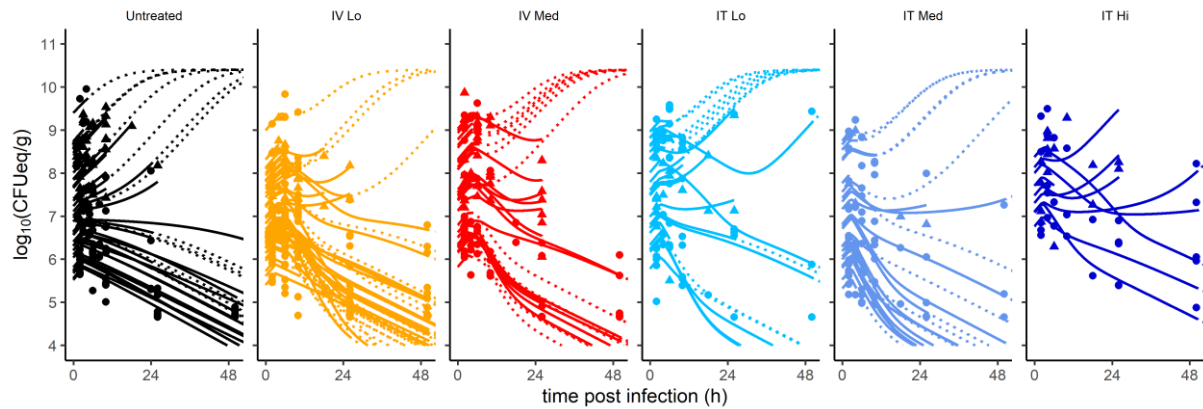
DECLARATION OF INTERESTS

Authors declare no competing interest.

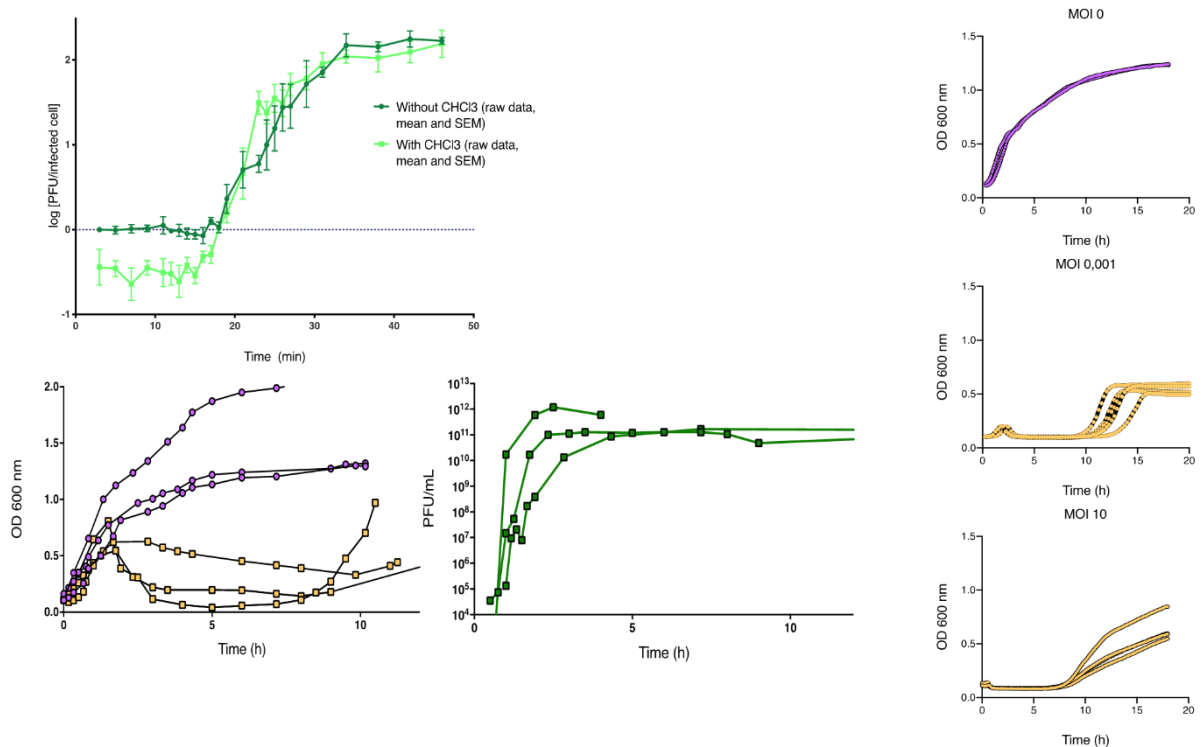
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure S1. Correlation between bioluminescence and CFU from lungs of infected and untreated mice (adjusted- $R^2=0.52$). The regression line equation is $\log_{10}(\text{CFU/g}) = 1.44 + 1.07 \log_{10}(\text{Bioluminescence})$. From 17 mice, 14 were infected with an inoculum of $7.6 \log_{10}$ CFU (grey dots) and 3 with an inoculum of $8.2 \log_{10}$ CFU (black dots).

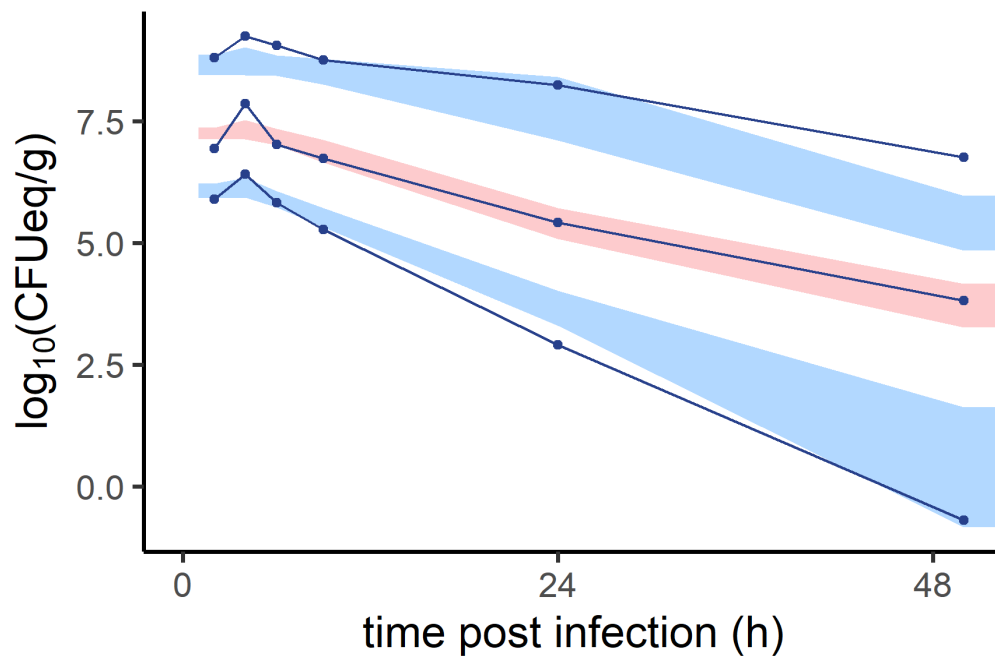


Supplementary Figure S2. Longitudinal bacterial load data and individual fits from all infected mice (N=183). Solid lines represent individual predictions from the infection time to the last observation time. The dotted lines are individual predictions starting from the sacrifice time point. Interrupted solid lines correspond to animal that die before the scheduled sacrifice time. Circles correspond to live animals while triangles correspond to animals at time of sacrifice after recording the bioluminescence.

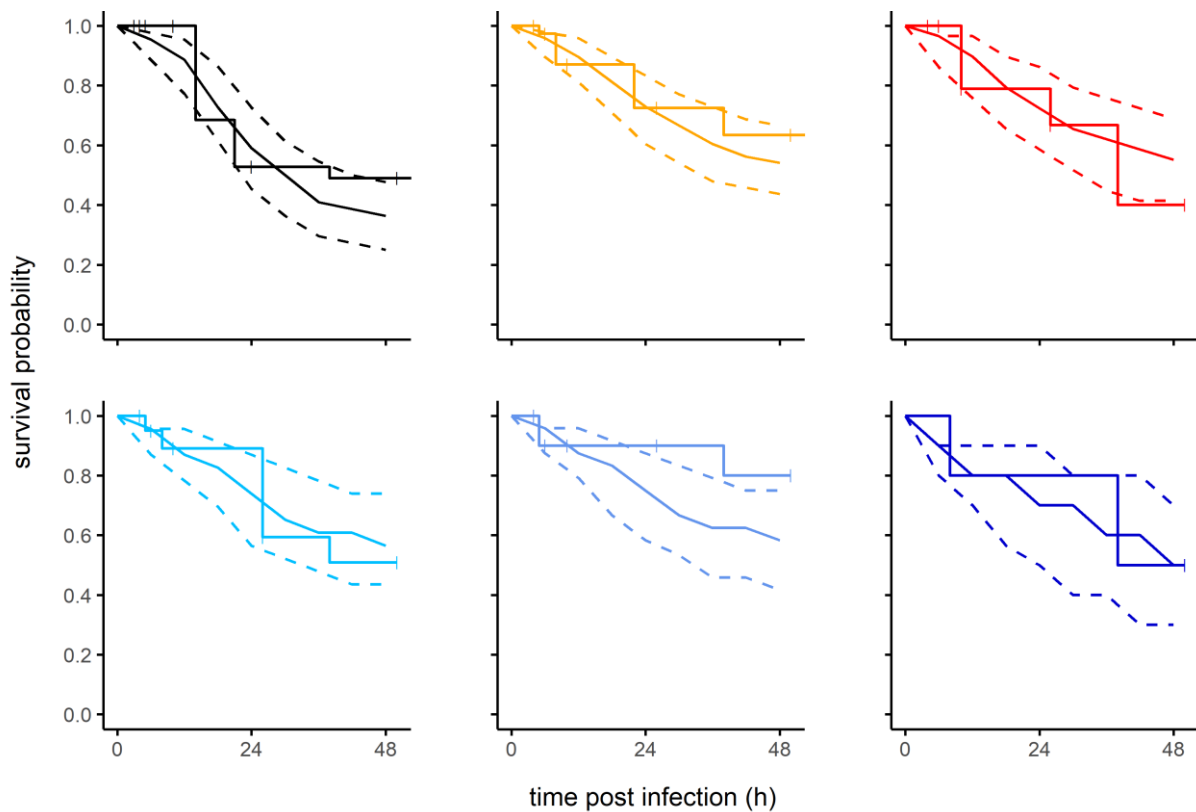


Supplementary Figure S3. *In vitro* experiments describing the dynamic interactions between strain 536 and phage 536_P1.

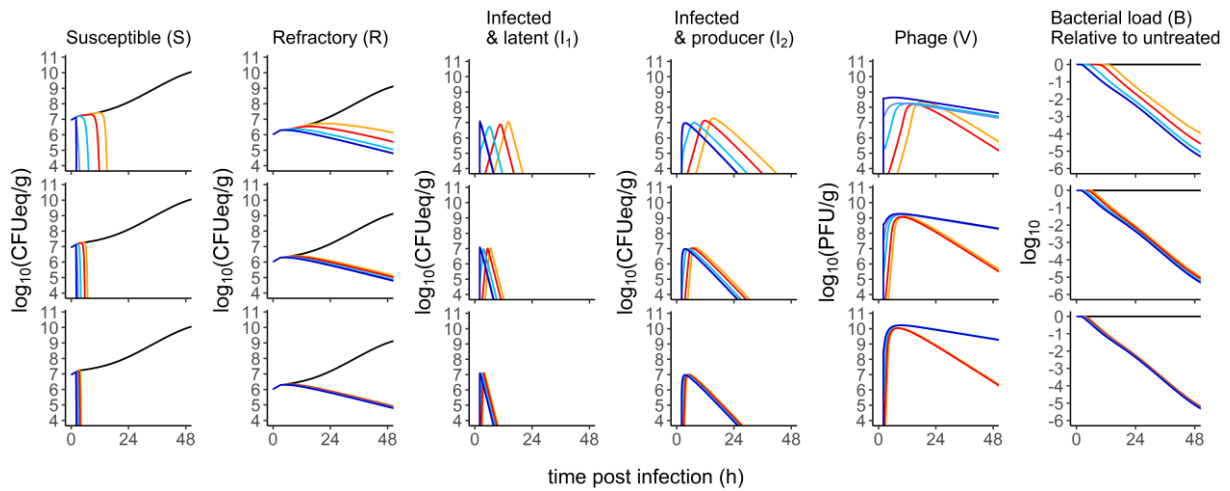
The one step growth data (3 replicates) are presented on top left, the dynamic quantification of strain 536 and phage 536_P1 (3 replicates at MOI 0 and at MOI 0.001) are presented on bottom left, and the kinetics of lysis (3 or 4 replicates at MOI 0, MOI 0.0001 and MOI 10) are presented on the right (see Supplementary methods).



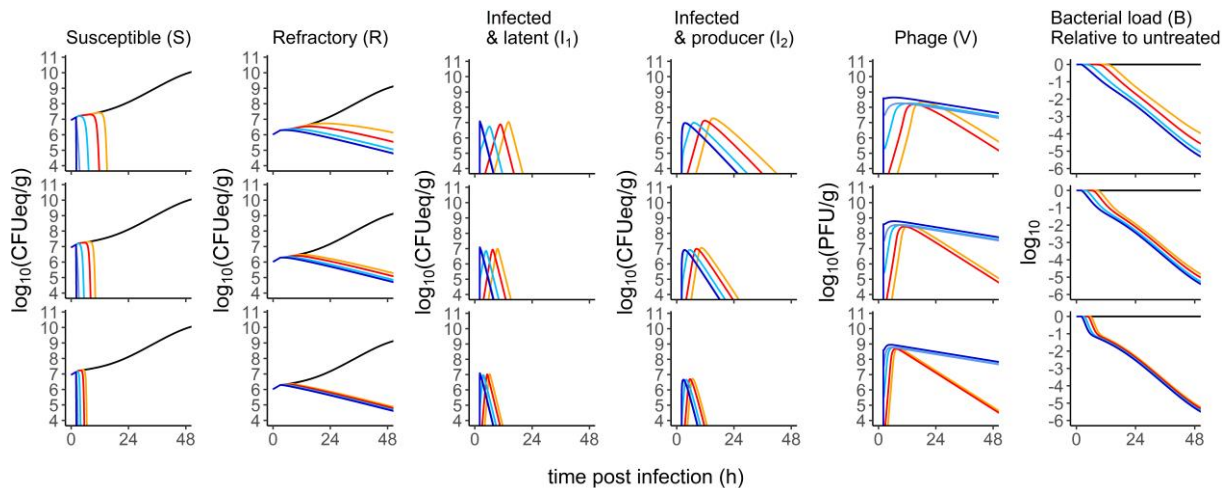
Supplementary Figure S4. Prediction-corrected visual predictive check plot for the bacterial load, using the final model. The 90% confidence intervals around the 10th (bottom), 50th (middle) and 90th (top) model-predicted percentiles, obtained from 1000 simulated data sets from the model, are represented as blue (10th and 90th percentiles) and pink (50th percentile) areas. The blue dots represent the 10th, 50th and 90th percentiles of the observations from the original data set.



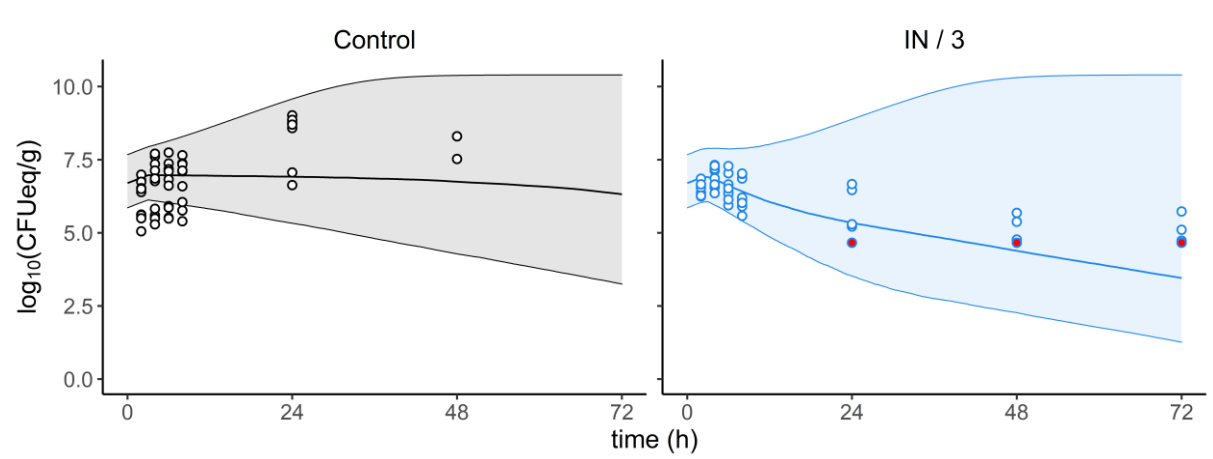
Supplementary Figure S5. Visual predictive check plot for the survival in each group, using the final model. Untreated mice are in black, phage 536_P1 treated mice (2 h after infection) groups are in colors, with different phage administration scheme: intravenously (IV) at low dose ($5.6 \log_{10}$ PFU) in orange or medium dose ($7.6 \log_{10}$ PFU) in red, intratracheally (IT) at low dose in cyan, medium dose in blue or high dose ($8.6 \log_{10}$ PFU) in dark blue (IT Hi). The dashed lines around the solid line represent the 10th (bottom), 50th (middle) and 90th (top) percentiles of survival obtained from 1000 simulated data sets from the model. The stepped line is the observed survival (Kaplan-Meier curve), with crosses representing censoring.



Supplementary Figure S6. Median profile of model predictions for different burst sizes: 57, 570 (*i.e.* the estimated value) and 5700 PFU/CFU in the top, middle, and bottom line, respectively), with a fixed inoculum of 7 log₁₀ CFUeq/g. Each column represents different model compartments: bacteria (S, R, I₁ and I₂) and phages in lungs. The last column represents the ratio of the total bacterial load ($B = S + R + I_1 + I_2$) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route of administration (IT or IV) and the dose of phage received (Lo: 5.6 log₁₀ PFU; Med: 7.6 log₁₀ PFU; Hi: 7.6 log₁₀ PFU): untreated (black), IV-Lo (orange), IV-Med (red), IT-Lo (cyan), IT-med (blue), IT-high (dark blue).



Supplementary Figure S7. Median profile of model predictions for different lysis rates: 0.09 (*i.e.* the estimated value in the final model), 0.27 and 1.39 h⁻¹ (*i.e.* the estimated value *in vitro*) in the top, middle, and bottom line, respectively, with a fixed inoculum of 7 log₁₀ CFUeq/g and a burst size of 57 PFU/CFU. Each column represents different model compartments: bacteria (S, R, I₁ and I₂) and phages in lungs. The last column represents the ratio of the total bacterial load ($B = S + R + I_1 + I_2$) in the treated groups to that of the untreated group. The colors are indicative of both the route of administration (IT or IV) and the dose of phage received (Lo: 5.6 log₁₀ PFU; Med: 7.6 log₁₀ PFU; Hi: 8.6 log₁₀ PFU): untreated (black), IV-Lo (orange), IV-Med (red), IT-Lo (cyan), IT-med (blue), IT-high (dark blue).



Supplementary Figure S8. External visual predictive checks

The circles correspond to CFUeq/g of observed bacterial loads recorded from live imaging of animals (inoculum of $7.6 \log_{10}$ of the bioluminescent strain 536) previously reported (Dufour et al., 2015) from the untreated group (infected and PBS-treated; black) on the left panel and from the phage-treated group (single intranasal administration of $1.2 \cdot 10^8$ PFU of phage 536_P1 2 h post infection; blue) on the right panel. The red dots correspond to threshold of detection of the light. Simulations ($N=2000$ in each group) based on our model have been performed, using an inoculum parameter corresponding to the median and the variability of the effective inoculum, observed 2 hours post infection (Dufour et al., 2015). In the simulations, the phage pharmacokinetics model and parameters were those of an intratracheal administration. The thick line corresponds to the median and the the colored areas included the 5th and the 95th percentiles of the simulations.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Purification of bacteriophages

Phage 536_P1 was amplified on strain 536 and purified by first, filtration of lysate to 0.1µm followed by tangential ultrafiltration (Vivaflow™, Sartorius, 100kDa), two ultracentrifugations on cesium chloride, dialysed against TN (Tris-HCl pH8, NaCl 150 mM), passed three times through an endotoxin removal column (Endotrap Blue, Hyglos, Germany) and filtered-sterilized at 0.22µm.

In vivo experiments

Intratracheal administration (20µL) was performed in anesthetized mice using elongated tips guided by the glottis visualization with a cold light. The correct position of the tip was checked by the liquid movement inside the tip caused by the ventilatory movement of the animal. The liquid was then expelled from the tip with a pipette, and 100 µL of air was then pushed to aerosolize the solution to the bronchoalveolar space. Mice were maintained in prone position during at least 5 minutes.

In vitro experiments

One-Step-Growth experiments

The one-step growth experiment was performed in triplicate, using Luria Bertani Broth (Lennox). As previously described (Hyman and Abedon, 2009), an exponential-phase culture (9 mL) of strain 536 (optical density at 600 nm 0.25, ie 9 log₁₀ CFU) was mixed with 1mL of 8 log₁₀ PFU of phage 536_P1 (MOI of 0.1). The mixture was placed under constant shaking (100 rpm) at 37°C. Duplicated samples were collected at 2-min intervals during 30 minutes. Six minutes after mixing phages and bacteria, the mixture was 1000 fold diluted in LB medium in order to lower bacterial concentration and avoid any reinfection. Out of the duplicated samples, one was immediately diluted and plated for phage titration, while the second was treated with 10% (vol/vol) chloroform to release intracellular phages in order to determine the eclipse period before phage titration.

Dynamic quantification of bacteria and phages over time

We first established the correlation between optical density and CFU for strain 536 by plating on LB agar dilutions of independent aliquots of exponentially growing cells from which OD600 nm was recorded before dilutions. Then, an exponential bacterial culture (50 mL of a total of 8.7 log₁₀ CFU) was mixed with 5.7 log₁₀ PFU (ie MOI 1.10⁻³) and incubated under constant shaking (150 rpm, 37°C). Samples from this mixture were withdrawn at specific time points to measure optical density at 600 nm and count the number of phages after serial dilutions and plating on LB agar covered with strain 536. Experiments were performed three times from independent cultures.

Kinetic of lysis

To assess the behavior of strain 536 in presence of phage 536_P1 at different MOI, OD600 nm was recorded over time from microtiter plates. In each well, 180 μ L of an exponential culture of strain 536 (OD 0.1) was mixed with 20 μ L of phage 536_P1 at different concentrations (each replicated six times) to reach MOI of 0.001; 0.01; 0.1; 1 and 10. Controls included wells with phage alone, or bacteria alone or LB alone. The microplates were incubated in a microplate reader (Tecan) set at 37°C during 12h with orbital agitation. Three independent experiments were performed.

***In vitro* data analysis**

Models of *in vitro* data were built using similar methodology used for analyzing *in vivo* PK/PD data: parameters of mixed models were estimated using SAEM algorithm and the model selection was based on BIC. Model of phage/bacteria interactions *in vitro* was built in three steps.

First, one step growth experiments reproduced a single lysis cycle of the phage and therefore allowed to estimate the burst size (*i.e.* the number of virions released from each bacterium lysed) and the time of a cycle, including an eclipse period. The best fit of these one step growth data was obtained using a multiple transit compartments model. The burst size (570 virions/CFU) was estimated with acceptable precision of estimation (relative standard error <30%). To confirm this burst size value which was higher than expected, another estimation method was used. A nonlinear regression was performed ($y(t) = E0 + \frac{Emax}{1+10^{(T50-t)\gamma}}$, with $y(t)$ in $\log_{10}$ PFU/infected cell, $E0$ the baseline, $Emax$ the plateau, $\log(T50)$ the time to reach $\frac{E0+Emax}{2}$ and γ a shape parameter) on the mean data from the three different experiments.

A burst size ($b = \frac{10^{Emax}-10^{E0}}{10^{E0}}$) of 554 virions/CFU was estimated from the estimates of this nonlinear regression, which was close to the value obtained from the nonlinear mixed effect model. The median period for a phage to produce and release new phages was estimated at 35 minutes. Second, bacterial growth was characterized from the above *in vitro* experiments exploiting the condition MOI 0 (without any phage). The bacterial doubling time was estimated at 63 minutes from the model. Third, lysis kinetics experiments (at MOI > 0) were modelled using a predator-prey model with similar structure to *in vivo* model (see equations and table of parameters below). The burst size and bacterial growth were fixed at values respectively obtained at the above first and second steps. The lysis rate (corresponding to rate between infected latent and infected productive bacteria) was fixed from one step growth experiments on 536_P1. The eclipse period was obtained by sensitivity analysis on the transition rate e . The proportion of phage-resistant clones at baseline and their relative fitness were characterized from this model.

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= \alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{10^{B_{max}}}\right) S - \beta VS \\ \frac{dI_1}{dt} &= \beta VS - eI_1 \\ \frac{dI_2}{dt} &= eI_1 - \delta_V I_2 \\ \frac{dR}{dt} &= w\alpha \left(1 - \frac{S + I_1 + I_2 + R}{10^{B_{max}}}\right) R \\ \frac{dV}{dt} &= -\beta VS + \delta_V bI_2\end{aligned}$$

TABLE S1. PARAMETER ESTIMATES OF THE FINAL *IN VITRO* MODEL

Parameter	Name	Unit	Fixed/Estimated from	Fixed effect (rse, %)	Sd of random effect (rse, %)
Bacterial growth rate	α	min ⁻¹	Coev + Lysis (MOI 0)	0.011 (-)	0 (-)
Initial number of susceptible	S_0	log ₁₀ CFU mL ⁻¹	Coev + Lysis (MOI 0)	7.9 (-)	0 (-)
Bacterial load plateau	B_{max}	log ₁₀ CFU mL ⁻¹	Coev + Lysis (MOI 0)	9.9 (-)	0 (-)
Infectivity rate	β	log ₁₀ mL CFU ⁻¹ min ⁻¹	Lysis (MOI > 0)	-9.6 (<1)	0.01 (26)
Transition rate	e	min ⁻¹	Lysis (MOI > 0)	0.02 (-)	0 (-)
Lysis rate	δ_V	min ⁻¹	Dufour et al., 2017	0.5 (-)	0 (-)
Burst size	b	PFU CFU ⁻¹	OSG	570 (-)	0 (-)
Initial number of resistant	R_0	log ₁₀ CFU mL ⁻¹	Lysis (MOI > 0)	6.7 (<1)	0.05 (10)
Relative fitness	w	-	Lysis (MOI > 0)	0.49 (4)	0.27 (10)
Additive error on bacterial load	σ_B	log ₁₀ PFU g ⁻¹	Lysis (MOI > 0)	-	0.1 (1)

Sd: standard deviation, rse: relative standard error

REFERENCES

- Alemayehu, D., Casey, P.G., McAuliffe, O., Guinane, C.M., Martin, J.G., Shanahan, F., Coffey, A., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriophages phiMR299-2 and phiNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *mBio* 3, e00029-00012.
- Aslam, S., Lampley, E., Wooten, D., Karris, M., Benson, C., Strathdee, S., and Schooley, R.T. (2020). Lessons Learned From the First 10 Consecutive Cases of Intravenous Bacteriophage Therapy to Treat Multidrug-Resistant Bacterial Infections at a Single Center in the United States. *Open forum infectious diseases* 7, ofaa389.
- Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.M., Simard, M., Olivier, M., and Bergeron, M.G. (1998). Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 66, 912-922.
- Bergstrand, M., Hooker, A.C., Wallin, J.E., and Karlsson, M.O. (2011). Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 13, 143-151.
- Brzuszkiewicz, E., Bruggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschlager, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., *et al.* (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12879-12884.
- Bull, J.J., Levin, B.R., DeRouin, T., Walker, N., and Bloch, C.A. (2002). Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol* 2, 35.
- Cairns, B.J., Timms, A.R., Jansen, V.A., Connerton, I.F., and Payne, R.J. (2009). Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog* 5, e1000253.
- Carmody, L.A., Gill, J.J., Summer, E.J., Sajjan, U.S., Gonzalez, C.F., Young, R.F., and LiPuma, J.J. (2010). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis* 201, 264-271.
- Chastre, J., and Fagon, J.Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 867-903.
- Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Tsertsvadze, G., Rimoldi, S.G., Nizharadze, D., Hoyle, N., *et al.* (2020). Eradication of a Multidrug-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolate Following Oral and Intra-rectal Therapy With a Custom Made, Lytic Bacteriophage Preparation. *Clin Infect Dis* 70, 1998-2001.
- Dabrowska, K., and Abedon, S.T. (2019). Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies. *Microbiol Mol Biol Rev* 83.
- Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., and Touqui, L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis* 201, 1096-1104.
- Desmee, S., Mentre, F., Veyrat-Follet, C., and Guedj, J. (2015). Nonlinear Mixed-effect Models for Prostate-specific Antigen Kinetics and Link with Survival in the Context of Metastatic Prostate Cancer: A Comparison by Simulation of Two-stage and Joint Approaches. *AAPS J* 17, 691-699.
- Dion, M.B., Oechslin, F., and Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125-138.
- Dufour, N., Debarbieux, L., Fromentin, M., and Ricard, J.D. (2015). Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages. *Crit Care Med* 43, e190-198.

Dufour, N., Delattre, R., Chevallereau, A., Ricard, J.D., and Debarbieux, L. (2019). Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 63.

Fihman, V., Messika, J., Hajage, D., Tournier, V., Gaudry, S., Magdoud, F., Barnaud, G., Billard-Pomares, T., Branger, C., Dreyfuss, D., *et al.* (2015). Five-year trends for ventilator-associated pneumonia: Correlation between microbiological findings and antimicrobial drug consumption. *Int J Antimicrob Agents* 46, 518-525.

Friberg, L.E., and Guedj, J. (2020). Acute bacterial or viral infection-What's the difference? A perspective from PKPD modellers. *Clin Microbiol Infect* 26, 1133-1136.

Gordillo Altamirano, F.L., and Barr, J.J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev* 32.

Hamet, M., Pavon, A., Dalle, F., Pechinot, A., Prin, S., Quenot, J.P., and Charles, P.E. (2012). *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 38, 1272-1279.

Henry, M., Lavigne, R., and Debarbieux, L. (2013). Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5961-5968.

Hyman, P., and Abedon, S.T. (2009). Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* 501, 175-202.

Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J.P., Que, Y.A., Resch, G., Rousseau, A.F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., *et al.* (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 19, 35-45.

Jennes, S., Merabishvili, M., Soentjens, P., Pang, K.W., Rose, T., Keersebilck, E., Soete, O., Francois, P.M., Teodorescu, S., Verween, G., *et al.* (2017). 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* 21, 129.

Jiang, W., Yan, Y., Ji, W., Wang, Y., and Chen, Z. (2014). Clinical significance of different bacterial load of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Braz J Infect Dis* 18, 124-128.

Kasman, L.M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmidt, M.G., and Norris, J.S. (2002). Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol* 76, 5557-5564.

Kollef, M.H., Ricard, J.D., Roux, D., Francois, B., Ischaki, E., Rozgonyi, Z., Boulain, T., Ivanyi, Z., Janos, G., Garot, D., *et al.* (2017). A Randomized Trial of the Amikacin Fosfomycin Inhalation System for the Adjunctive Therapy of Gram-Negative Ventilator-Associated Pneumonia: IASIS Trial. *Chest* 151, 1239-1246.

Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., and Turner, P.E. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* 25, 219-232.

Kuhn, E., and Lavielle, M. (2005). Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Computational Statistics & Data Analysis* 49, 1020-1038.

La Combe, B., Clermont, O., Messika, J., Eveillard, M., Kouatchet, A., Lasocki, S., Corvec, S., Lakhal, K., Billard-Pomares, T., Fernandes, R., *et al.* (2019). Pneumonia-Specific *Escherichia coli* with Distinct Phylogenetic and Virulence Profiles, France, 2012-2014. *Emerg Infect Dis* 25, 710-718.

Leitner, L., Ujmajuridze, A., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkonია, I., Rigvava, S., Chkhotua, A., Changashvili, G., McCallin, S., Schneider, M.P., *et al.* (2020). Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis*.

Leung, C.Y.J., and Weitz, J.S. (2017). Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol* 429, 241-252.

Levin, B.R., Baquero, F., Ankomah, P.P., and McCall, I.C. (2017). Phagocytes, Antibiotics, and Self-Limiting Bacterial Infections. *Trends Microbiol* 25, 878-892.

Lin, Y., Quan, D., Yoon Kyung Chang, R., Chow, M.Y.T., Wang, Y., Li, M., Morales, S., Britton, W.J., Kutter, E., Li, J., *et al.* (2020). Synergistic activity of phage PEV20-ciprofloxacin combination powder formulation-A proof-of-principle study in a *P. aeruginosa* lung infection model. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*.

Lourenco, M., Chaffringeon, L., Lamy-Besnier, Q., Pedron, T., Campagne, P., Eberl, C., Berard, M., Stecher, B., Debarbieux, L., and De Sordi, L. (2020). The Spatial Heterogeneity of the Gut Limits Predation and Fosters Coexistence of Bacteria and Bacteriophages. *Cell Host Microbe* 28, 390-401 e395.

Luong, T., Salabarria, A.C., and Roach, D.R. (2020). Phage Therapy in the Resistance Era: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Clin Ther* 42, 1659-1680.

Marriott, H.M., and Dockrell, D.H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res* 33, 493-505.

Marshall, S., Madabushi, R., Manolis, E., Krudys, K., Staab, A., Dykstra, K., and Visser, S.A.G. (2019). Model-Informed Drug Discovery and Development: Current Industry Good Practice and Regulatory Expectations and Future Perspectives. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* 8, 87-96.

Melo, L.D.R., Oliveira, H., Pires, D.P., Dabrowska, K., and Azeredo, J. (2020). Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. *Crit Rev Microbiol* 46, 78-99.

Messika, J., Magdoud, F., Clermont, O., Margetis, D., Gaudry, S., Roux, D., Branger, C., Dreyfuss, D., Denamur, E., and Ricard, J.D. (2012). Pathophysiology of Escherichia coli ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 38, 2007-2016.

Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., and Debarbieux, L. (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One* 6, e16963.

Morin, C.E., and Kaper, J.B. (2009). Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine in vivo-induced promoters in the Vibrio cholerae vaccine strain CVD 103-HgR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57, 69-79.

Oechslin, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J.M., Resch, G., and Que, Y.A. (2017). Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears Pseudomonas Aeruginosa Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J Infect Dis* 215, 703-712.

Payne, R.J., and Jansen, V.A. (2001). Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J Theor Biol* 208, 37-48.

Payne, R.J., and Jansen, V.A. (2003). Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin Pharmacokinet* 42, 315-325.

Perelson, A.S., and Guedj, J. (2015). Modelling hepatitis C therapy--predicting effects of treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12, 437-445.

Pouillot, F., Chomton, M., Blois, H., Courroux, C., Noelig, J., Bidet, P., Bingen, E., and Bonacorsi, S. (2012). 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* 56, 3568-3575.

Roach, D.R., Leung, C.Y., Henry, M., Morello, E., Singh, D., Di Santo, J.P., Weitz, J.S., and Debarbieux, L. (2017). Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is

Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 22, 38-47 e34.

Sarker, S.A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., *et al.* (2016). Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* 4, 124-137.

Schooley, R.T., Biswas, B., Gill, J.J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J.J., Reed, S.L., Rohwer, F., Benler, S., *et al.* (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61.

Smith, A.M., McCullers, J.A., and Adler, F.R. (2011). Mathematical model of a three-stage innate immune response to a pneumococcal lung infection. *J Theor Biol* 276, 106-116.

Smith, H.W., Huggins, M.B., and Shaw, K.M. (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol* 133, 1111-1126.

Sousa, J.A.M., and Rocha, E.P.C. (2019). Environmental structure drives resistance to phages and antibiotics during phage therapy and to invading lysogens during colonisation. *Sci Rep* 9, 3149.

Weld, R.J., Butts, C., and Heinemann, J.A. (2004). Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *J Theor Biol* 227, 1-11.

III. DISCUSSION : Aller plus loin que la résistance

1. La réalité de la résistance *in vivo*

L'impact de l'émergence de bactéries devenues résistantes aux bactériophages au cours d'un traitement demeure mal évalué.

Deux revues de la littérature reportent les expériences animales de phagothérapie au cours desquelles des résistances aux bactériophages ont été recherchées (52,60). La majorité des études rapportent une émergence de mutants résistants au bactériophage administré. Il s'agit donc d'une réalité dont la dimension est prise en compte dans les modèles PK/PD.

Chez l'Homme, il a aussi été constaté le même phénomène (29,61) mais dans les cas cliniques rapportés, de nouveaux bactériophages ont pu être utilisés. C'est un avantage notable de la phagothérapie, de disposer de bactériophages alternatifs facilement accessibles. Les bactériophages peuvent être recherchés dans des milieux naturels ou à partir du patient lui-même. Ils peuvent aussi être modifiés génétiquement par génie moléculaire. C'est ce qui a été fait dans le cas d'un traitement d'un patient infecté à *Mycobacterium abscessus* qui a reçu un cocktail de trois bactériophages dont deux modifiés génétiquement (39).

Avec B. Gaborieau que j'ai encadré durant son Master 2, nous avons voulu caractériser les bactéries résistantes au bactériophage 536_P1 au terme du traitement d'une pneumonie à *E. coli* 536 dans un modèle murin et les comparer à celles obtenues au cours d'une co-évolution *in vitro*.

In vitro, nous avons collecté les bactéries après 4 heures de co-évolution avec le bactériophage 536_P1. Ce temps correspond au moment où la densité bactérienne est la plus faible. Après avoir levé la pression de sélection par le bactériophage par des ré-isollements successifs nous avons isolé les bactéries résistantes et Baptiste a séquencé leurs génomes. Les mutations retrouvées se concentrent à près de 80% sur la voie de biosynthèse du LPS (récepteur putatif du bactériophage), ainsi que pour près de 20% sur la voie de biosynthèse de la capsule K15.

In vivo, nous avons ré-utilisé le modèle animal mis au point par N. Dufour au cours duquel les souris préalablement infectées par une dose létale de la bactérie 536 par voie intranasale est ensuite traitée par une seule dose du bactériophage 536_P1 (22). N Dufour retrouvait dans ses études une survie des souris à 72h de 100 % versus 0% pour les souris non traitées.

Nous avons sacrifié des animaux à 8 et 48 heures après l'administration du bactériophage et collecté les bactéries dans les poumons. Dès H8, et qui plus est à H48, nous avons retrouvé des bactéries résistantes au bactériophage. Les gènes impliqués dans la résistance touchaient les mêmes voies métaboliques que les mutants collectés *in vitro* (Figure 16).

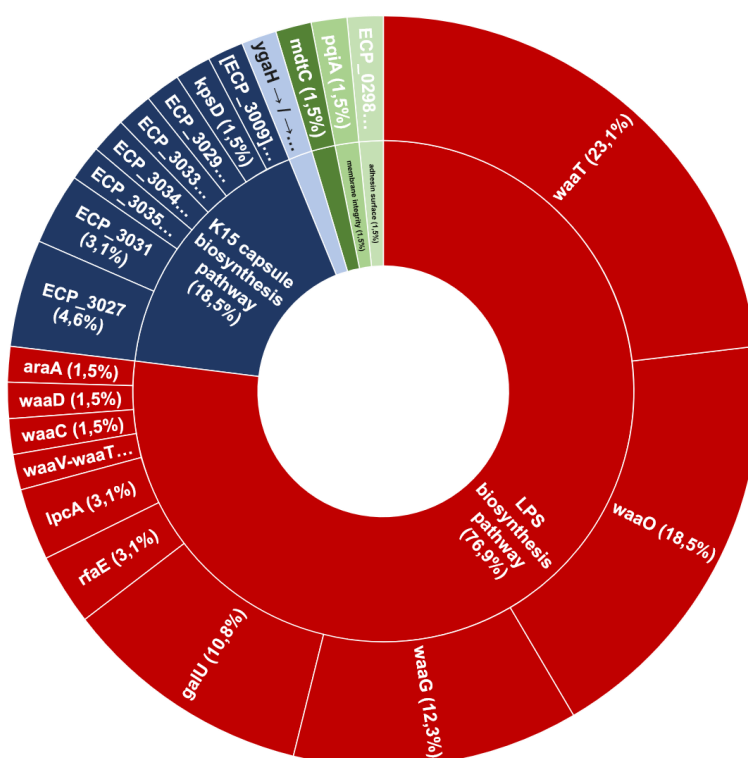


Figure 16 : Répartition des mutations retrouvées chez les bactéries résistantes obtenues *in vitro* et *in vivo* à H8 et H48.

2. Quel impact de la résistance ?

Devant ce constat, il faut se souvenir que N. Dufour obtenait une survie excellente malgré la présence de ces bactéries résistantes. B. Gaborieau a testé la virulence de certains clones

résistants obtenus *in vivo* en testant leur létalité dans le modèle murin de pneumonie précédemment décrit (Figure 17).

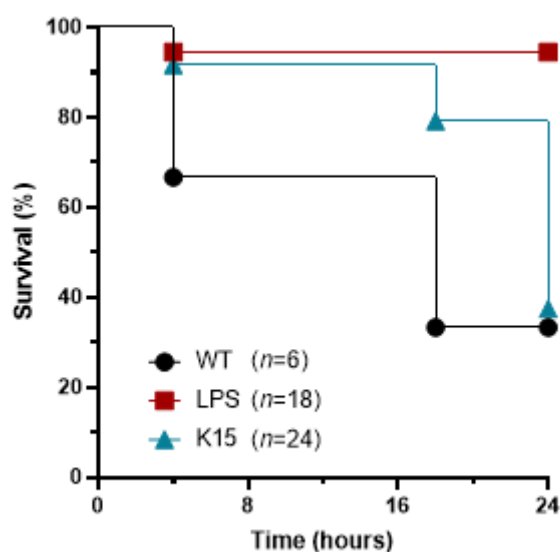


Figure 17 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie d'animaux infectés par différentes souches d'*E. coli* 536.

Une même dose de bactéries, WT (n=6), ou de trois clones mutés dans la voie de biosynthèse du LPS (n=18) ou de quatre clones mutés dans la voie de biosynthèse de la capsule K15 (n=24) a été administrée par voie intranasale aux animaux à t=0. La survie des animaux a été observée pendant 24h. La virulence des souches mutées dans la voie du LPS est fortement diminuée alors que celle des souches dont les mutations affectent la biosynthèse de la capsule K15 demeure inaltérée.

La perte de virulence constatée au cours de ce travail a déjà été observée à maintes reprises au cours d'expérimentations animales (60). Les mutations intervenues peuvent réduire la virulence des bactéries lorsque les bactériophages utilisent une structure en relation avec celle-ci (Figure 18) (19), ou induire une resensibilisation à un antibiotique (79), ou aussi altérer le métabolisme des bactéries, les rendant moins compétitives, ou encore en changer la perception par le système immunitaire (73) .



Élément sous droits, diffusion non autorisée.

Figure 18 : Mutations de surface de bactéries (bacilles Gram négatif en A, cocci Gram positif en B) avec acquisition de résistances aux bactériophages. En parallèle réduction du fitness et de la virulence des souches. De Mangalea et al. (80)

3. La résistance *in vivo* : une stratégie de contrôle microbien ?

Les bactériophages peuvent donc exercer un effet modulateur sur la virulence des souches. Bien que cet effet soit difficile aujourd'hui à anticiper lorsque l'on considère un potentiel bactériophage « médicament », il présente un intérêt évident dans le contexte d'infections chroniques complexes.

La mucoviscidose est une pathologie génétique au cours de laquelle la dysfonction de l'épithélium respiratoire cause des infections respiratoires, souvent responsables de la mortalité des jeunes patients. Les germes en cause sont multiples, et les infections et

colonisations sont très fréquemment plurimicrobiennes avec des interactions complexes (Figure 19) (82).

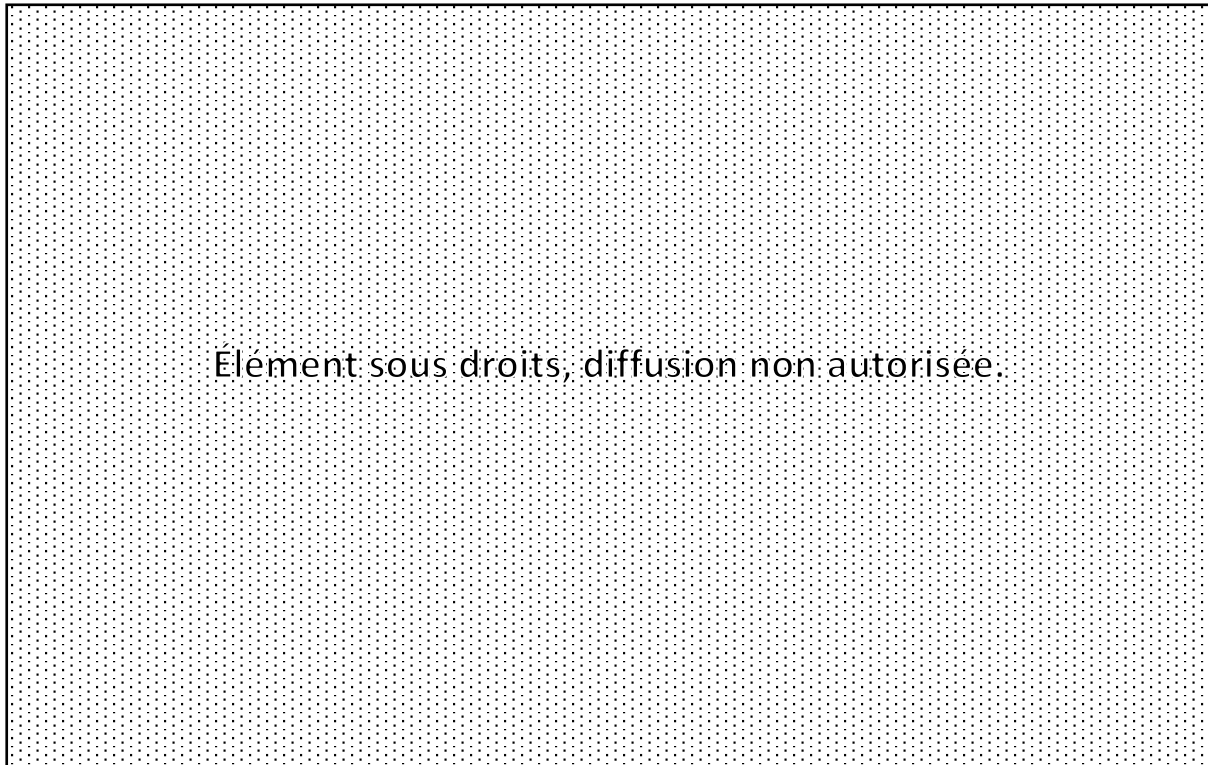


Figure 19 : Incidence des infections bactériennes au cours de la vie de patients atteints de mucoviscidose (d'après Cystic Fibrosis Foundation).

Dans cette pathologie, vouloir traiter tous les pathogènes en présence dans le poumon est illusoire. Par ailleurs, éradiquer une espèce bactérienne c'est laisser vacant une niche écologique pour une prochaine infection. En revanche, permettre la persistance d'espèces avirulentes ou peu virulentes est une approche intéressante qui doit être testée. Dans ce cas l'utilisation de bactériophages ciblant des facteurs de virulence pourrait se révéler être attractifs (83). Quelques cas dans la littérature ont montré l'intérêt que pourrait avoir cette approche dans la mucoviscidose mais ils nécessitent d'être étayés (84).

CONCLUSION

Pendant ma thèse, j'ai principalement travaillé sur la pharmacométrie des bactériophages qui demeure un sujet peu étudié alors qui représente un jalon incontournable en vue du redéploiement de la phagothérapie.

Il est apparu, comme nous l'avons vu dans la partie II.B-1 que les bactériophages ont une pharmacocinétique qui dépend de leurs propriétés physico-chimiques qui sont très diverses et s'apparentent à celles des nanoparticules non enveloppées. Cette PK est défavorable à une administration systémique car la demi-vie dans le sang est très courte et les barrières épithéliales uniquement franchissables par des voies endocytosiques.

Néanmoins, les travaux réalisés dans le cadre de l'étude que nous avons publiée ont aussi montré qu'une administration locale (dans notre cas pulmonaire) permettait d'obtenir des concentrations dans l'organe d'intérêt élevées avec une élimination différée. Par ailleurs et surtout, nous avons prouvé que les contraintes PK étaient levées dans un contexte infectieux, avec d'une part des barrières épithéliales plus permissives et d'autre part une amplification des bactériophages qui contrecarre l'élimination rapide de ceux-ci par le MPS. Nous avons pu quantifier l'effet des bactériophages et modéliser l'impact des paramètres du cycle infectieux (burst-size,...) sur la décroissance bactérienne. Nous avons fait intervenir les dimensions de la résistance bactérienne et du système immunitaire de l'hôte pour rendre compte des résultats observés. Il reste à appréhender dans quelle mesure le modèle proposé issu d'une infection pulmonaire aigüe est généralisable à d'autres situations.

De nombreuses recherches restent encore à mener. Aujourd'hui, l'efficacité de la phagothérapie chez le sujet immunocompétent n'est plus à prouver (21,22,85–89). En revanche, le cadre optimal d'application de la phagothérapie est loin d'être bien défini : infections aiguës ? infections chroniques ? Y a-t-il des sites infectieux à privilégier, à éviter, des bactéries à cibler particulièrement ?

La toxicité des bactériophages a été étudiée sous plusieurs aspects : l'impact sur le microbiote, la possible stimulation de la réponse immunitaire antivirale et le relargage d'endotoxines par

les bactéries lysées. Les données obtenues jusqu'à présent sont tout à fait rassurantes. La toxicité apparaît à bien des égards moindre que celle des antibiotiques. Il reste néanmoins des points à éclaircir concernant l'impact de la réponse immunitaire anti-bactériophages dans un contexte de sepsis.

Le choix du bactériophage en fonction du récepteur bactérien ciblé est certainement une approche intéressante. En choisissant, par exemple, un bactériophage s'adsorbant sur un récepteur facteur de virulence, on soumet la bactérie à une pression de sélection qui pousse vers la perte de virulence. Le choix du bactériophage pourrait aussi se faire à l'aune de son interaction avec le système immunitaire pour en favoriser la synergie d'une part, et pour d'autre part ne pas induire de réponse immunitaire anti-virale exacerbée. Il faudrait aussi continuer à explorer les mécanismes de résistance bactérienne pour pouvoir mieux les anticiper, les contrôler, voire les utiliser lors des administrations en pratique clinique.

À côté des recherches qu'il reste à mener, d'autres acteurs doivent se mobiliser pour que la phagothérapie puisse se développer à l'échelle nationale ou européenne. Comme toute thérapeutique mettant en œuvre des substances biologiques la mise au point de la phagothérapie nécessite la coopération de plusieurs acteurs complémentaires et une organisation spécifique, soit un travail multidisciplinaire avec des interactions fortes entre les différents partenaires dont des équipes de recherche.

Dans l'attente, et possiblement en complément, de spécialités pharmaceutiques « prêt-à-porter » qui auront obtenu une AMM, des équipes de médecins et de pharmaciens cliniciens continueront à administrer des préparations magistrales dans le cas de patients en impasse thérapeutique. Un développement rationnel de la phagothérapie « sur-mesure » supposera un accès centralisé aux bactériophages avec une banque, telle que celle initiée par l'Institut Pasteur en collaboration avec l'équipe IAME/APHP/Inserm, qui collecte les bactériophages, les stocke et rassemble le maximum de données sur chacun : taxonomie, génome, spectre d'activités, récepteur ciblé, cycle lytique ou lysogénique, caractéristiques physico-chimiques.

Des plateformes de production des médicaments à base de bactériophages devront être créées, comme celle prévue par Les Hospices-Civils de Lyon qui ont lancé le projet PHAG-ONE. La plateforme envisagée devrait permettre de produire des solutions de bactériophages actifs sur 3 espèces de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, et *Escherichia*

coli). Les phases d'isolement des bactériophages, la production, la purification et le conditionnement des solutions ainsi que les contrôles de qualité devront répondre à des règles encore en cours d'élaboration. Une structure de contrôle externe des solutions produites devra également être mise en place.

Il est certain que la réussite de la phagothérapie ne passera que par une coordination efficace et un travail collaboratif et transversal des différents acteurs impliqués (Figure 20).

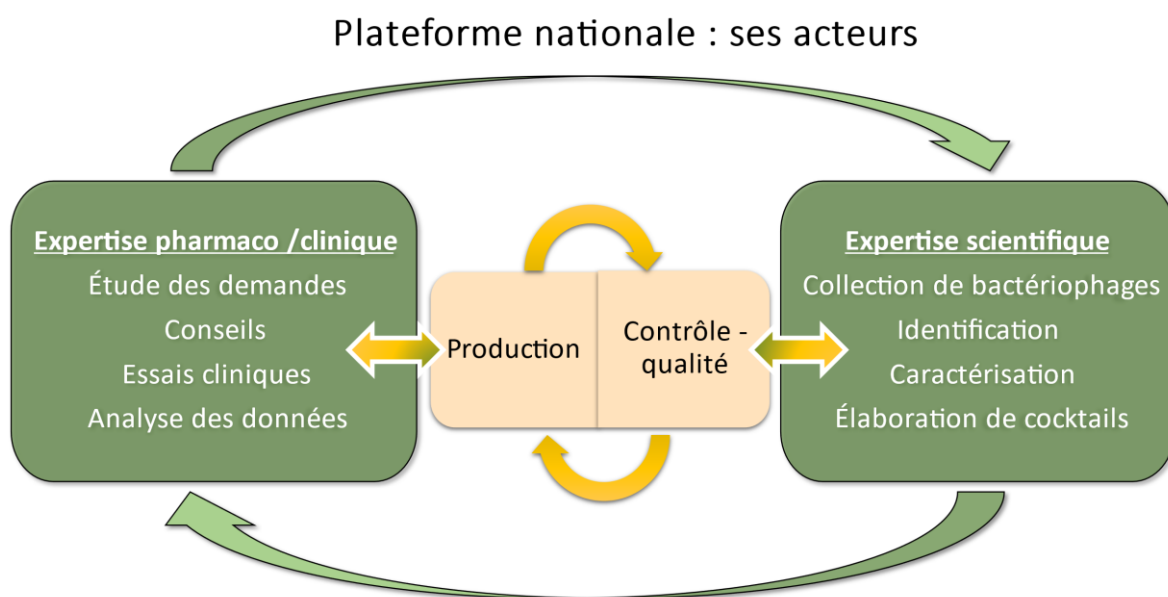


Figure 20 : Schéma de l'interaction des différents acteurs requis pour une utilisation des bactériophages en pratique clinique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dublanchet Alain. Autobiographie de Félix d'Hérelle Les pérégrinations d'un bactériologiste. 2017. (Editions Médicales internationales).
2. Krueger AP, Scribner EJ. THE BACTERIOPHAGE: ITS NATURE AND ITS THERAPEUTIC USE. J Am Med Assoc. 17 mai 1941;116(20):2269.
3. Tran-Dien A, Le Hello S, Bouchier C, Weill F-X. Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study. Lancet Infect Dis. févr 2018;18(2):207-14.
4. Cesta N, Di Luca M, Corbellino M, Tavio M, Galli M, Andreoni M. Bacteriophage therapy: an overview and the position of Italian Society of Infectious and Tropical Diseases. Infez Med. 1 sept 2020;28(3):322-31.
5. Watson A, Li H, Ma B, Weiss R, Bendayan D, Abramovitz L, et al. Human antibodies targeting a *Mycobacterium* transporter protein mediate protection against tuberculosis. Nat Commun. déc 2021;12(1):602.
6. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Front Microbiol. 16 oct 2020;11:582779.
7. Chen CH, Lu TK. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. Antibiotics. 13 janv 2020;9(1):24.
8. Victor HAUGUEL. L'avenir du marché des probiotiques dans le domaine de la santé. archives-ouvertes.fr; 2021.
9. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 31 janv 2013;368(5):407-15.
10. Park H, Laffin MR, Jovel J, Millan B, Hyun JE, Hotte N, et al. The success of fecal microbial transplantation in *Clostridium difficile* infection correlates with bacteriophage relative abundance in the donor: a retrospective cohort study. Gut Microbes. 2 nov 2019;10(6):676-87.
11. Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. mars 2000;64(1):69-114.
12. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. Viruses. 18 mars 2021;13(3):506.
13. Campbell A. The future of bacteriophage biology. Nat Rev Genet. juin 2003;4(6):471-7.

14. McNair K, Bailey BA, Edwards RA. PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 mars 2012;28(5):614-8.
15. Dubos RJ, Straus JH, Pierce C. THE MULTIPLICATION OF BACTERIOPHAGE IN VIVO AND ITS PROTECTIVE EFFECT AGAINST AN EXPERIMENTAL INFECTION WITH SHIGELLA DYSENTERIAE. *J Exp Med*. 1 sept 1943;78(3):161-8.
16. Morton HE, Perez-Otero JE. The Increase of Bacteriophage in Vivo During Experimental Infections with *Shigella paradysenteriae*, Flexner, in Mice. *J Bacteriol*. mars 1945;49(3):237-44.
17. Geier MR, Trigg ME, Merrill CR. Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature*. 23 nov 1973;246(5430):221-3.
18. Gigante A, Atterbury RJ. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. *Virol J*. 12 déc 2019;16(1):155.
19. Smith HW, Huggins MB. Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. *Microbiology*. 1 août 1983;129(8):2659-75.
20. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. nov 2005;71(11):6554-63.
21. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis*. 1 avr 2010;201(7):1096-104.
22. 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):e190-198.
23. Dufour N, Clermont O, La Combe B, Messika J, Dion S, Khanna V, et al. Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex. *J Antimicrob Chemother*. nov 2016;71(11):3072-80.
24. 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 Infect*. juin 2014;16(6):512-7.
25. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis*. 15 févr 2003;187(4):613-24.
26. Patil R, Patil T, Hussain KMA. *Staphylococcus lugdunensis* native tricuspid valve endocarditis: a case report and review of literature. *J Gen Intern Med*. oct 2011;26(10):1209-11.

27. 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*. 01 2017;215(5):703-12.
28. Chanishvili N. Bacteriophages as Therapeutic and Prophylactic Means: Summary of the Soviet and Post Soviet Experiences. *Curr Drug Deliv*. 20 mai 2016;13(3):309-23.
29. Zhvania P, Hoyle NS, Nadareishvili L, Nizharadze D, Kutateladze M. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Front Med*. 3 juill 2017;4:94.
30. Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Żaczek M, Międzybrodzki R, Letkiewicz S, Łusiak-Szelchowska M, et al. Prospects of Phage Application in the Treatment of Acne Caused by *Propionibacterium acnes*. *Front Microbiol* [Internet]. 8 févr 2017 [cité 12 août 2021];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00164/full>
31. Leszczyński P, Weber-Dabrowska B, Kohutnicka M, Łuczak M, Górecki A, Górski A. Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a healthcare worker — Case report. *Folia Microbiol (Praha)*. mai 2006;51(3):236-8.
32. Strój L, Weber-Dabrowska B, Partyka K, Mulczyk M, Wójcik M. [Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn]. *Neurol Neurochir Pol*. juin 1999;33(3):693-8.
33. Ferry T, Kolenda C, Batailler C, Gustave C-A, Lustig S, Malatray M, et al. Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection. *Front Med*. 16 nov 2020;7:570572.
34. Cano EJ, Caflisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, et al. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. *Clin Infect Dis*. 1 juill 2021;73(1):e144-51.
35. Uimajuridze A, Jvania G, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Sybesma W, Managadze L, et al. 265 Phage therapy for the treatment for urinary tract infection: Results of in-vitro screenings and in-vivo application using commercially available bacteriophage cocktails. *Eur Urol Suppl*. mars 2016;15(3):e265.
36. Letkiewicz S, Międzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis — case report. *Folia Microbiol (Praha)*. sept 2009;54(5):457-61.
37. Maddocks S, Fabijan AP, Ho J, Lin RCY, Ben Zakour NL, Dugan C, et al. Bacteriophage Therapy of Ventilator-associated Pneumonia and Empyema Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 nov 2019;200(9):1179-81.

38. Law N, Logan C, Yung G, Furr C-LL, Lehman SM, Morales S, et al. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*. août 2019;47(4):665-8.
39. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med*. mai 2019;25(5):730-3.
40. 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*. janv 2019;19(1):35-45.
41. Phagoburn clinical trial [Internet]. Disponible sur: <http://www.phagoburn.eu>
42. 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.
43. Grubb DS, Wrigley SD, Freedman KE, Wei Y, Vazquez AR, Trotter RE, et al. PHAGE-2 Study: Supplemental Bacteriophages Extend *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04 Benefits on Gut Health and Microbiota in Healthy Adults. *Nutrients*. 17 août 2020;12(8):2474.
44. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I, Rigvava S, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis*. mars 2021;21(3):427-36.
45. Wright A, Hawkins CH, Anggård 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 Off J ENT-UK Off J Neth Soc Oto-Rhino-Laryngol Cervico-Facial Surg*. août 2009;34(4):349-57.
46. Gencay YE, Gambino M, Prüssing TF, Brøndsted L. The genera of bacteriophages and their receptors are the major determinants of host range. *Environ Microbiol*. juin 2019;21(6):2095-111.
47. 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*. mai 2017;7(1):46151.
48. Yu P, Mathieu J, Li M, Dai Z, Alvarez PJJ. Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. Dozois CM, éditeur. *Appl Environ Microbiol*. févr 2016;82(3):808-15.
49. Schwartz DJ, Langdon AE, Dantas G. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Med*. déc 2020;12(1):82.

50. Hosseinidoust Z, Tufenkji N, van de Ven TGM. Predation in Homogeneous and Heterogeneous Phage Environments Affects Virulence Determinants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. mai 2013;79(9):2862-71.
51. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. mai 2010;8(5):317-27.
52. Azam AH, Tanji Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl Microbiol Biotechnol*. mars 2019;103(5):2121-31.
53. Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol*. févr 2020;18(2):113-9.
54. Wang C, Nie T, Lin F, Connerton IF, Lu Z, Zhou S, et al. Resistance mechanisms adopted by a *Salmonella* Typhimurium mutant against bacteriophage. *Virus Res*. nov 2019;273:197759.
55. Seed KD, Faruque SM, Mekalanos JJ, Calderwood SB, Qadri F, Camilli A. Phase Variable O Antigen Biosynthetic Genes Control Expression of the Major Protective Antigen and Bacteriophage Receptor in *Vibrio cholerae* O1. Satchell KJF, éditeur. *PLoS Pathog*. 13 sept 2012;8(9):e1002917.
56. Scanlan PD, Buckling A. Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *ISME J*. juin 2012;6(6):1148-58.
57. Luria SE, Delbrück M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*. nov 1943;28(6):491-511.
58. Mizoguchi K, Morita M, Fischer CR, Yoichi M, Tanji Y, Unno H. Coevolution of Bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol*. janv 2003;69(1):170-6.
59. Smith HW, Huggins MB. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *J Gen Microbiol*. 2 janv 1982;128(2):307-18.
60. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 30 juin 2018;10(7):351.
61. 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* [Internet]. oct 2017 [cité 19 sept 2021];61(10). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00954-17>
62. Kalil AC, Syed A, Rupp ME, Chambers H, Vargas L, Maskin A, et al. Is Bacteremic Sepsis Associated With Higher Mortality in Transplant Recipients Than in Nontransplant

- Patients? A Matched Case-Control Propensity-Adjusted Study. Clin Infect Dis. 15 janv 2015;60(2):216-22.
63. Tiwari BR, Kim S, Rahman M, Kim J. Antibacterial efficacy of lytic *Pseudomonas* bacteriophage in normal and neutropenic mice models. J Microbiol. déc 2011;49(6):994-9.
 64. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, et al. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. Cell Host Microbe. 12 juill 2017;22(1):38-47.e4.
 65. Leung CY (Joey), Weitz JS. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. J Theor Biol. sept 2017;429:241-52.
 66. Cai R, Wang G, Le S, Wu M, Cheng M, Guo Z, et al. Three Capsular Polysaccharide Synthesis-Related Glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, Are Associated With Virulence and Phage Sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 28 mai 2019;10:1189.
 67. Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. Clin Infect Dis. 1 juin 2017;64(11):1582-8.
 68. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. août 2019 [cité 30 août 2021];63(8). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00379-19>
 69. Yerushalmy O, Khalifa L, Gold N, Rakov C, Alkalay-Oren S, Adler K, et al. The Israeli Phage Bank (IPB). Antibiotics. 21 mai 2020;9(5):269.
 70. Djebara S, Maussen C, De Vos D, Merabishvili M, Damanet B, Pang K, et al. Processing Phage Therapy Requests in a Brussels Military Hospital: Lessons Identified. Viruses. 17 mars 2019;11(3):265.
 71. Kutateladze M, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. Médecine Mal Infect. août 2008;38(8):426-30.
 72. Żaczek M, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Phage Therapy in Poland – a Centennial Journey to the First Ethically Approved Treatment Facility in Europe. Front Microbiol. 5 juin 2020;11:1056.
 73. McCallin S, Sarker SA, Sultana S, Oechslin F, Brüssow H. Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy *Staphylococcus aureus* carriers: *Eastern phage cocktails against S. aureus*. Environ Microbiol. sept 2018;20(9):3278-93.

74. 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.
75. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *Ojcius DM, éditeur. PLoS ONE*. 20 mars 2009;4(3):e4944.
76. You L, Suthers PF, Yin J. Effects of *Escherichia coli* Physiology on Growth of Phage T7 In Vivo and In Silico. *J Bacteriol*. avr 2002;184(7):1888-94.
77. Payne RJ, Jansen VA. Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *J Theor Biol*. 7 janv 2001;208(1):37-48.
78. Cairns BJ, Timms AR, Jansen VAA, Connerton IF, Payne RJH. Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog*. janv 2009;5(1):e1000253.
79. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. juill 2016;6(1):26717.
80. Mangalea MR, Duerkop BA. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Ottemann KM, éditeur. Infect Immun [Internet]*. 22 juin 2020 [cité 2 sept 2021];88(7). Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00926-19>
81. Lin T-L, Hsieh P-F, Huang Y-T, Lee W-C, Tsai Y-T, Su P-A, et al. Isolation of a Bacteriophage and Its Depolymerase Specific for K1 Capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in Typing and Treatment. *J Infect Dis*. 1 déc 2014;210(11):1734-44.
82. Ibberson CB, Whiteley M. The social life of microbes in chronic infection. *Curr Opin Microbiol*. févr 2020;53:44-50.
83. Gurney J, Brown SP, Kaltz O, Hochberg ME. Steering Phages to Combat Bacterial Pathogens. *Trends Microbiol*. févr 2020;28(2):85-94.
84. Zaldastanishvili E, Leshkasheli L, Dadiani M, Nadareishvili L, Askilashvili L, Kvatadze N, et al. Phage Therapy Experience at the Eliava Phage Therapy Center: Three Cases of Bacterial Persistence. *Viruses*. 23 sept 2021;13(10):1901.
85. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2007;51(6):1934-8.
86. Trigo G, Martins TG, Fraga AG, Longatto-Filho A, Castro AG, Azeredo J, et al. Phage Therapy Is Effective against Infection by *Mycobacterium ulcerans* in a Murine Footpad Model. *Johnson C, éditeur. PLoS Negl Trop Dis*. 25 avr 2013;7(4):e2183.
87. 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.

88. Cervený KE, DePaola A, Duckworth DH, Gulig PA. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect Immun.* nov 2002;70(11):6251-62.
89. Danelishvili L, Young LS, Bermudez LE. *In Vivo* Efficacy of Phage Therapy for *Mycobacterium avium* Infection As Delivered by a Nonvirulent Mycobacterium. *Microb Drug Resist.* mars 2006;12(1):1-6.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
PRÉAMBULE :.....	9
I. INTRODUCTION À LA PHAGOTHÉRAPIE	11
A. La phagothérapie et sa place dans la lutte contre les bactéries.....	11
1. La découverte de la phagothérapie	11
2. Le succès des antibiotiques et leur revers	12
3. Les alternatives aux antibiotiques.....	15
B. La phagothérapie : une alternative prometteuse aux antibiotiques.....	17
1. Qu'est-ce qu'un bactériophage ?	17
2. Comment discriminer un bactériophage virulent d'un tempéré ?	19
3. La caractérisation de l'effet antibactérien des bactériophages.....	20
4. L'efficacité dans les modèles animaux.....	21
5. Et chez l'Homme ?	22
C. Les bactériophages : un médicament pas comme les autres	25
1. Un spectre d'action bien plus étroit que celui des antibiotiques	25
2. À la recherche du cocktail anti- <i>E. coli</i> :	29
3. La résistance des bactéries aux bactériophages : un problème insurmontable ? ...	32
4. Le rôle du système immunitaire.....	35
5. Un traitement sans toxicité retrouvée	35
D. Un accès limité aux bactériophages.....	38
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE :	42
II. RÉSULTATS.....	43
A. Trouver le cadre réglementaire :	43
1 La qualification juridique des bactériophages	44

2.	Dans quel cadre juridique administrer des bactériophages à un patient ?.....	46
B.	Trouver la juste dose	58
1.	Pharmacocinétique en phagothérapie : une revue analytique de la littérature	58
	METHODS	62
	BACTERIOPHAGES : A TRULY DIVERSE CLASS OF NANOPARTICLES	63
A.	Nanoparticles and PK.....	64
B.	PK study on phages : how can we proceed ?	66
II.	PHAGES PK IN HEALTHY ANIMAL	67
A.	IV administration:	67
1.	Half-lives :	69
2.	VD:	70
B.	IP administration:.....	70
C.	Other systemic administration routes: IM and SC	73
D.	Oral route	74
1.	A non-systematic and variable passage from intestinal space to bloodstream.....	74
2.	Mechanisms underlying the translocation	77
E.	The glomerular barrier.....	78
F.	The cerebral barrier	79
1.	General considerations and nanoparticles	79
2.	In phages studies	80
3.	In Dubos study	81
III.	METABOLIZATION AND ELIMINATION	83
A.	Nanoparticles and the MPS	83
B.	Phages and the MPS	84
IV.	INFECTED ANIMAL.....	86
A.	Sepsis, an alteration of the host that impacts phage PK.....	86

B.	Modification of the phage behavior: from nanoparticle to biological agent.....	87
C.	Ability to reach infected organs.....	89
V.	CONCLUSION :	91
2.	Étude <i>in vivo</i> de phagothérapie expérimentale chez l'animal couplée à un modèle PK/PD	100
	INTRODUCTION.....	104
	RESULTS.....	107
A.	Biodistribution of phage in uninfected mice.....	107
B.	Bacterial kinetics in infected-untreated mice	109
C.	Bacterial and phage kinetics in infected treated mice.....	110
D.	Unraveling bacteria-phage interaction using a mathematical model	111
E.	Effects of phage dose and route of administration on the bacterial kinetics	113
F.	Effects of phage characteristics on the bacterial kinetics.....	115
	DISCUSSION.....	116
	METHODS.....	119
A.	Determination of <i>in vitro</i> infection parameters of phage 536_P1	119
B.	Presentation of the murine model of pulmonary phage therapy	119
C.	Bioluminescence and longitudinal follow up of bacterial load in lungs	120
D.	Phage distribution	121
E.	Bacterial kinetics in untreated mice.....	122
F.	Phage-bacteria interaction in treated mice	122
G.	Impact of bacterial kinetics on survival.....	124
H.	Model evaluation	124
I.	Model based simulations for the impact of treatment procedures and phage parameter values.....	125
J.	Ethic statement	125

ACKNOWLEDGMENTS.....	126
AUTHORS CONTRIBUTION	126
DECLARATION OF INTERESTS	126
SUPPLEMENTARY FIGURES.....	127
SUPPLEMENTARY MATERIAL	133
REFERENCES.....	136
III. DISCUSSION : Aller plus loin que la résistance	140
1. La réalité de la résistance <i>in vivo</i>	140
2. Quel impact de la résistance ?	141
3. La résistance <i>in vivo</i> : une stratégie de contrôle microbien ?.....	143
CONCLUSION	145
BIBLIOGRAPHIE.....	148
TABLE DES MATIÈRES	156
ANNEXES.....	160

ANNEXES

ANNEXE I : The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams

Nicolas Dufour, Raphaëlle Delattre, Jean-Damien Ricard, and Laurent Debarbieux

***Clinical Infectious Diseases*, 2017**

ANNEXE II : Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice

Nicolas Dufour, Raphaëlle Delattre, Anne Chevallereau, Jean-Damien Ricard, and Laurent Debarbieux

***Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019**

ANNEXE III : GUIDE PRATIQUE SUR LES BACTERIOPHAGES: de l'approvisionnement à l'administration

Version janvier 2021

Anthia Monribot, Raphaëlle Delattre, Nicolas Dufour, Camille D'humieres, Nathalie Pons-Kerjean, Julie Bataille

The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams

Nicolas Dufour,^{1,2,3} Raphaëlle Delattre,^{1,3,4} Jean-Damien Ricard,^{2,3,5} and Laurent Debarbieux¹

¹Institut Pasteur, Department of Microbiology, Molecular Biology of Gene in Extremophiles, Paris; ²Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Louis Mourier, Service de Réanimation Médico-Chirurgicale, Colombes; ³INSERM, IAME, UMR 1137, Paris; ⁴AP-HP, Hôpital Beaujon, Service d'Anesthésie-Réanimation, Clichy; and ⁵Université Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

(See the Editorial Commentary by Reindel and Fiore on pages 1589–90.)

Background. Other than numerous experimental data assessing phage therapy efficacy, questions regarding safety of this approach are not sufficiently addressed. In particular, as phages can kill bacterial cells within <10 minutes, the associated endotoxin release (ER) in severe infections caused by gram-negative bacteria could be a matter of concern.

Methods. Two therapeutic virulent phages and 4 reference antibiotics were studied in vitro for their ability to kill 2 pathogenic strains of *Escherichia coli* and generate an ER. The early interaction (first 3 hours) between these actors was assessed over time by studying the instantaneous cell viability, the colony-forming unit count, the concentration of free endotoxin released, and the cell morphology under light microscope.

Results. While β -lactams have a relatively slow effect, both tested phages, as well as amikacin, were able to rapidly abolish the bacterial growth. Even when considering the fastest phage (cell lysis in 9 minutes), the concentrations of phage-induced ER never reached the highest values, which were recorded with antibiotic treatments. Cumulative concentrations of endotoxin over time in phage-treated conditions were lower than those observed with β -lactams and close to those observed with amikacin. Whereas β -lactams were responsible for strong cell morphology changes (spheroplast with imipenem, filamentous cells with cefoxitin and ceftriaxone), amikacin and phages did not modify cell shape but produced intracellular inclusion bodies.

Conclusions. This work provides important and comforting data regarding the safety of phage therapy. Therapeutically relevant phages, with their low endotoxin release profile and fast bactericidal effect, are not inferior to β -lactams.

Keywords. phage therapy; endotoxin; safety; cell lysis; β -lactams.

As bacteria, particularly gram-negative, are more resistant than ever to multiple antibiotics, the search for alternative treatments is now strongly promoted by international organizations and governments (United Nations, World Health Organization, and G20 [1]). Besides their ability to control bacterial growth, these alternatives must also be evaluated regarding their safety. In particular, the strategies leading to the physical destruction of bacterial cells have to be studied with respect to their ability to release endotoxin (as many antibiotics do), especially in clinical situations where patients suffer from high-inoculum infections and/or experience severe sepsis or septic shock.

Bacteriophages (phages) are viruses infecting bacteria, and their use to treat bacterial infections (phage therapy) has been the focus of many experimental studies as well as a few clinical trials [2–4]. However, while initiated almost 100 years ago, many aspects of phage therapy safety have not yet been fully investigated. Given their capability of killing their hosts very rapidly, in minutes, the important safety issue related to the release of endotoxin has been poorly explored [5, 6].

Bacterial endotoxin (the hydrophobic domain of the lipopolysaccharide present in the outer membrane of gram-negative bacteria) is one of the most potent inducers of the proinflammatory cytokine response in patients infected by gram-negative pathogens, and it plays an important role in the pathophysiology of septic shock [7]. Accordingly, blood endotoxin level in infected patients is correlated to the sepsis severity and to survival [8–10]. Of note, bactericidal antibiotics provoke an endotoxin release (ER) over time and the amplitude of this release depends on the pharmacological class of the molecule [11]. As assessed by in vitro and in vivo data in animals [11], the use of potent endotoxin-releasing antibiotics can be detrimental in terms of inflammation and survival. In humans, even if the use of such antibiotics could be associated with a higher

Received 20 October 2016; editorial decision 24 December 2016; accepted 27 February 2017; published online March 1, 2017.

Correspondence: L. Debarbieux, Institut Pasteur, Department of Microbiology, Molecular Biology of Gene in Extremophiles, 25 Rue du Dr Roux, Paris 75015, France (laurent.debarbieux@pasteur.fr).

Clinical Infectious Diseases® 2017;64(11):1582–8

© The Author 2017. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/cid/cix184

inflammatory response, this has not translated—to date—in differences in mortality [12, 13].

To our knowledge, only 2 studies have addressed the question of phage-induced ER using a lysis-deficient phage [14] or a nonlytic (filamentous) phage expressing a toxic gene in the host [15]. They showed that such phages released less endotoxin than wild-type ones [14] or than a lytic phage used as control [15]. However, none of these studies compared phages to different antibiotics in their respective ability to release endotoxin within a short time scale corresponding to the rapid lysis induced by phages.

In this study, we aimed to compare the early-stage killing efficiency of 2 virulent phages, 536_P1 and LM33_P1, both infecting clinical isolates of *Escherichia coli*, to 2 classes of antibiotics, as well as to determine the level of endotoxin released by these antibacterial agents. We found that both phages killed bacteria more rapidly and released less endotoxin than did β -lactams. These results argue that phages are not more harmful than some antibiotics routinely used in the clinical setting.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria and Phages

Escherichia coli strain 536 (susceptible to all clinically relevant antibiotics) and strain LM33 (ST131-O25b:H4 clonal complex) are 2 clinical isolates, responsible for a pyelonephritis [16] and a ventilator-associated pneumonia [17], respectively. The infectious parameters of phage 536_P1 (a Myoviridae, 149.4 kbp, infecting strain 536 [18]) were determined as described in [17] and compared with those previously obtained with LM33_P1 (a Podoviridae, 38.9 kbp, infecting strain LM33 [17]). Data are presented in Table 1 and in Supplementary Figure 1. These phages were purified from a bacterial lysate using our standard protocol [19], including a final endotoxin removal step (EndoTrap Blue, Hyglos, Germany) carried out 3 times.

Table 1. Parameters of the Viral Cycle of Phage LM33_P1 and 536_P1

Parameter	LM33_P1	536_P1
Adsorption constant ^a , mL/min (95% CI)	$K_1 = 1.2 \times 10^{-8}$ (1.1 to 1.3×10^{-8})	$K_1 = 6.7 \times 10^{-8}$ (5.0 to 8.4×10^{-8})
	...	$K_2 = 5.1 \times 10^{-9}$ (4.4 to 5.8×10^{-9})
Latent period ^b , min	9	19
Eclipse period ^c , min	7	17
Burst size, PFU (95% CI)	317 (289–345)	176 (161–193)

Abbreviations: CI, confidence interval; PFU, plaque forming unit.

^aPhage LM33_P1 has a 1-step adsorption kinetic whereas phage 536_P1 has a 2-step kinetic (a fast one followed by a slower one; see Supplementary Data), leading to 2 different adsorption constants.

^bThe latent period corresponds to the time elapsed between cell infection and cell lysis.

^cThe eclipse period corresponds to time elapsed between cell infection and the detection of the first functional intracellular virions, before cell lysis.

Antibiotics: Choice, Susceptibility Testing, and Concentration

The disk diffusion method and Etests (bioMérieux, France) were used to determine susceptibility to antibiotics and minimum inhibitory concentration (MIC), according to EUCAST guidelines. For strain 536, the following antibiotics were tested (the MIC is indicated in brackets): amikacin (2 mg/L), ceftriaxone (0.016 mg/L), and imipenem (0.125 mg/L). For strain LM33, which expresses an extended-spectrum β -lactamase, the antibiotics tested were amikacin (8 mg/L), ceftiofur (2 mg/L), and imipenem (0.125 mg/L). The antibiotic solutions were prepared extemporaneously from intravenous formulations used for humans (Mylan, Canonsburg, Pennsylvania) and were reconstituted with sterile endotoxin-free water (aqua ad iniectionem, B-Braun, Germany) to be used at a final concentration of 8-fold the MIC. This antibiotic concentration was chosen according to in vitro and in vivo data related to pharmacodynamics and pharmacokinetics of aminoglycosides and β -lactams [20–23]. Such concentrations are also a recommended objective in the clinical situations where severe infections are presents, to ensure an optimal bactericidal activity [24]. For the same purpose, the phages were used at a multiplicity of infection (MOI) >1 (MOI: 5), based on our previous in vivo data [17–19, 25].

Time-Killing Assays

Classical time-killing assays were performed according to the American Society for Microbiology guidelines [26]. In brief, bacteria exponentially grown at 37°C, 150 rpm, in Mueller-Hinton II broth (Sigma-Aldrich, Germany) were diluted with fresh medium to obtain an OD_{600nm} of 0.015 (approximately 5.10^7 cells/mL). Thirty milliliters were then evenly aliquoted in 5 Erlenmeyer flasks corresponding to the 5 different conditions: a culture without antibacterial agents; cultures with antibiotics 1, 2, and 3; and a culture with phages. At time 0 (T_0), antibacterial agents were added and each flask was sampled at 15, 30, 45, 60, and 180 minutes. The control (without antibacterial agents) was also sampled at T_0 . The bacterial titer (in triplicate), the instantaneous bacterial viability (in triplicate), and the free endotoxin level (in duplicate) were determined. The detection threshold for the count of colony-forming units (CFUs) is 1×10^2 CFU/mL. Killing assays (and subsequent analysis) were independently repeated twice for each strain.

Microscope observations were performed on samples taken at 180 minutes with the remaining volume of culture. After centrifugation (7000g, 5 minutes), the pellet was resuspended in 100 μ L of phosphate-buffered saline and 5 μ L was dropped on a glass slide to be observed with a phase contrast microscope.

Endotoxin Measurements

Free endotoxin concentrations were quantitatively assayed on filtered cultures (Poly-Ethylene-Sulfone 0.22 μ m filter, Sartorius, France) using a Limulus Amebocyte Lysate assay (Endotox R-factor C, Hyglos, Germany), after a 1:1000 dilution and

according to the manufacturer instructions. The validity of the assay was checked; no interferences caused by the medium or the phages were noticed.

Instantaneous Cell Viability Assay

Cell viability was assessed by measuring the intracellular adenosine triphosphate content using the BactTiter-Glo assay and a Glomax-MultiDetection System plate reader (Promega, Madison, Wisconsin).

Statistical Analysis and Modeling

Nonlinear regressions from experimental points regarding the evolution of the free endotoxin concentration according to time were performed by using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, California) with the following equations (where y = endotoxin concentration, x = time): the data obtained with Ceftriaxone treatment were ruled by an exponential curve $\{y = y_0 e^{kx}\}$, amikacin and phages were ruled by a reverse exponential curve $\{y = y_0 + (\text{plateau} - y_0) \cdot (1 - e^{-kx})\}$, whereas imipenem and cefoxitin were ruled by a sigmoid function $\{y = (V_{\max} \cdot x^h) / (K + x^h)\}$ (see Supplementary Tables 1 and 2). The areas under the concentration of free endotoxin vs time curve (AUC) were calculated using the trapeze method with MatLab 8.3 (MathWorks, France). The input for these calculations was the nonlinear regression curves obtained from each replicate (integration from 0 to 180 minutes, sampling frequency: every 20 seconds).

RESULTS

Phages Kill Bacteria Faster Than β -Lactams

Bacteria grown in liquid broth were exposed to antibiotics (8-fold the MIC) or phages (MOI of 5) and multiple samplings were performed during 180 minutes for the evaluation of killing and ER.

Bacterial abundance was assessed using 2 complementary methods that analyze 2 distinct physiological signals: the classical CFU count on agar medium (following an overnight incubation of serial dilutions) and an instantaneous cell viability assay that measures the amount of metabolically active cells. Indeed, the latter parameter is not taken into account with the agar plate method: The cells that are alive but doomed to death a few hours later will not be counted on agar plates, whereas they will be quantified by using the cell viability assay. Conversely, when bacteria are titrated on an agar plate, the inhibitory pressure is removed, especially as a high dilution is performed to count individualized CFUs: in such a setting, weakly metabolically active bacteria are no longer surrounded by the antibacterial agent and could regrow at the time of plating (as persister cells do [27]).

We observed that the decrease of cells able to grow on an agar plate (CFU counts, Figure 1) and the decrease of metabolically active cells (instantaneous cell viability assay, Figure 2) were faster with phages than with β -lactams (whatever the molecule considered). Aminoglycosides and phages were the only antibacterial agents to rapidly decrease the bacterial biomass indirectly assessed by the cell viability assay, while at the earliest stages, β -lactams did not abolish cell growth. After 1 hour, the reduction in CFU counts in phage-treated conditions reached 3.9 and 4.7 $\log_{10}$ for strains LM33 and 536, respectively, while amikacin provided a decrease of 3.0 and 4.7 $\log_{10}$, respectively, and imipenem a decrease of 0.2 and 1.7 $\log_{10}$.

In agreement with its kinetic characteristics (Table 1), phage LM33_P1 was the fastest antibacterial agent on strain LM33 as CFUs were below the threshold of detection (100 cells) at 15 minutes (Figure 1A). Among antibiotics, only amikacin led to a 2 $\log_{10}$ reduction at this time point. When looking at metabolically active cells, we also confirmed that phage LM33_P1 was the fastest killing agent, followed by amikacin, cefoxitin,

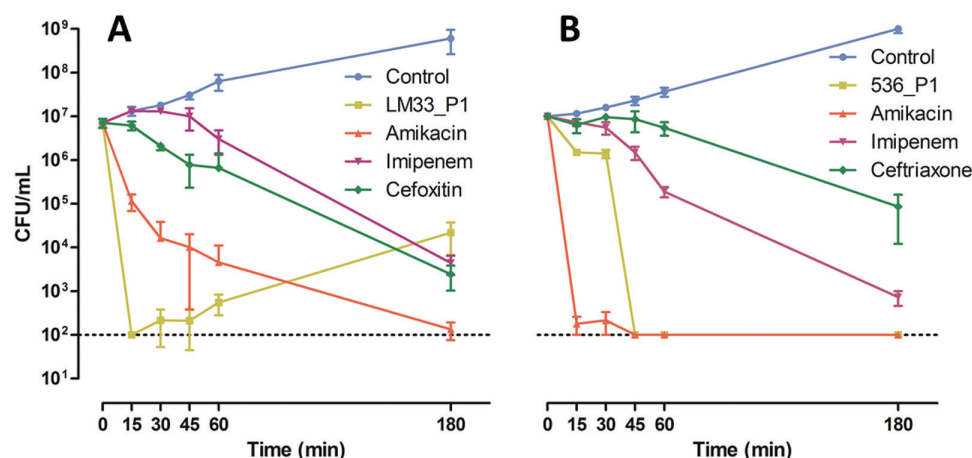


Figure 1. Colony-forming unit (CFU) counts of strains LM33 and 536 according to time. Strain LM33 (A) and strain 536 (B) were cultured in absence (control) or presence of antibacterial agents: phages (LM33_P1 or 536_P1, multiplicity of infection of 5) or antibiotics (8-fold the minimum inhibitory concentration). Data are means with standard deviation, and the dotted line represents the detection threshold.

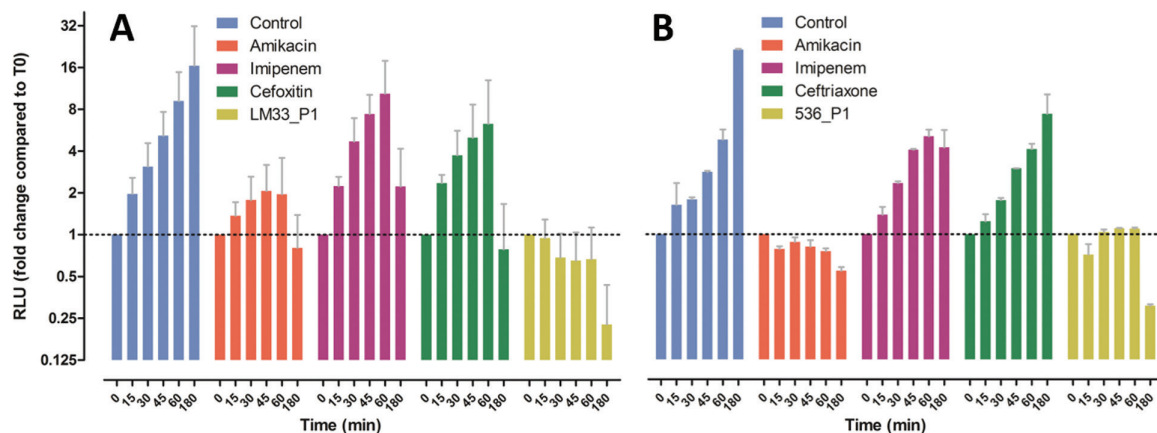


Figure 2. Relative amount of metabolically active cells according to time in presence of different antibacterial agents. Strain LM33 (A) and strain 536 (B) were cultured in absence (control) or presence of antibacterial agents: phages (LM33_P1 or 536_P1, multiplicity of infection of 5) or antibiotics (8-fold the minimum inhibitory concentration). The viable cells were quantified using an ATP-driven luciferase assay (see Methods). Data are means with standard deviation and the y-axis is in $\log_2$ scale. Abbreviation: RLU, relative luminescence unit.

and imipenem (Figure 2A). It should also be noted that at 180 minutes (Figure 1A), the number of CFUs in the phage-treated sample increased compared to previous time points, while in contrast the number of metabolically active cells remained very low. This suggests that a residual population with low metabolic activity was able to survive in the presence of phages and later to grow on agar plates once the phage pressure is reduced.

As suggested by its intrinsic viral properties (Table 1), phage 536_P1 displayed a slower kinetic than phage LM33_P1 in reducing CFU count and the amount of metabolically active cells. Phage 536_P1 was also slower than amikacin but remained faster than imipenem and ceftriaxone. The fact that the action of amikacin was faster on strain 536 than on strain LM33 is most likely explained by the underlying resistance mechanisms to aminoglycosides of each strain: the MIC of amikacin for strain 536 is 2 mg/L and this strain displays a resistance to streptomycin only whereas strain LM33 has several additional resistances to aminoglycosides (streptomycin, kanamycin, gentamicin, and netilmicin) with an amikacin MIC of 8 mg/L, which is the upper limit to classify *E. coli* strains as still susceptible [28].

The Morphology of Bacterial Cells Exposed to Amikacin or Phages Is Weakly Affected

Direct microscopic observations, performed after 3 hours of exposition to each of the antibacterial agents, confirmed that β -lactams induced intense cell morphological changes (Figure 3): Ceftriaxone and, to a lesser extent, cefoxitin were responsible for a massive filamentation whereas imipenem was associated with the generation of spherical cells, also known as spheroplasts [29]. Conversely, the cells obtained from cultures treated with amikacin or phages showed a preserved shape. Interestingly, these cells contained typical intracellular inclusion bodies, without any identifiable difference between amikacin and phage-treated cells (Figure 3).

Phages Release as Much Endotoxin as Amikacin but Much Less Than β -Lactams

The levels of released endotoxin were measured over time for each antibacterial agent tested (Figure 4). Initially (T_0), the concentrations of free endotoxin in the medium were 1578 ± 652 and 430 ± 20 EU/mL for strains LM33 and 536, respectively. The ER according to time was not identical among the antibacterial agents tested (Figure 4). Whereas the ceftriaxone-associated ER was ruled by an exponential curve, amikacin and phages were ruled by a reverse exponential curve (a rapid rise followed by a plateau) and imipenem with cefoxitin by a sigmoid function. Particularly, the kinetic of ER was initially slow for ceftriaxone but increased suddenly at later time points, a phenomenon also present but to a weaker extent with imipenem.

Compared to T_0 , the fold change in the amount of endotoxin released by the lysis of strain LM33 after 180 minutes was 3.8 ± 0.03 with phage LM33_P1, 5.5 ± 2.0 with amikacin, 8.7 ± 2.6 with cefoxitin, and 30.0 ± 16.7 with imipenem. With strain 536, this fold change was 19.8 ± 0.1 with amikacin, 29.9 ± 1.3 with phage 536_P1, 53.7 ± 4.2 with imipenem, and 125.1 ± 27.5 with ceftriaxone.

To obtain a more complete overview of the ER, we calculated the AUC that represent the cumulated amount of released endotoxin over time (Figure 5). The lowest recorded values were those obtained with the 2 phages and amikacin whereas the highest values were obtained with imipenem and ceftriaxone. In the experiments with strains LM33 and 536, respectively, the ER was 4- and 2-fold higher with imipenem than with the corresponding phage.

DISCUSSION

The safety of antimicrobial agents developed to resolve the progression of antibiotic resistance must be studied and compared to reference treatments. In this respect, the direct

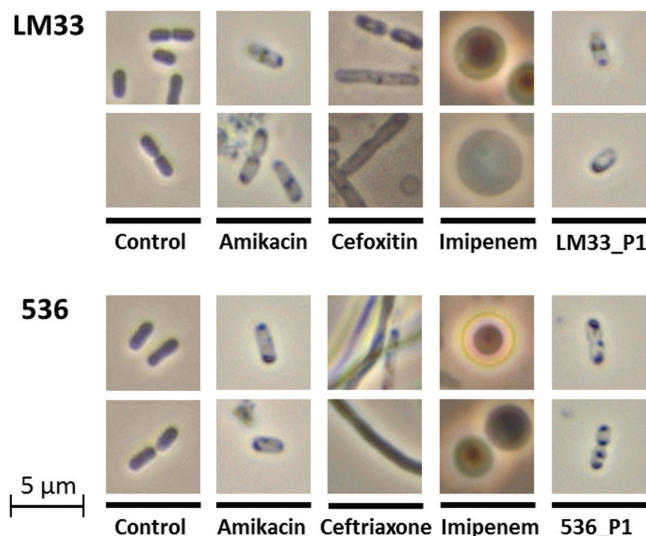


Figure 3. Morphology of *Escherichia coli* cells after a 3-hour exposition to different antibacterial agents. The liquid cultures of strains LM33 and 536 in absence (control) or presence of antibacterial agents (antibiotics with a concentration of 8-fold the minimum inhibitory concentration, phages LM33_P1 or 536_P1 with a multiplicity of infection of 5) were centrifuged to concentrate the residual biomass. Wet mount preparations were then observed under phase contrast ($\times 100$ lens).

immunogenicity of phage particles involving innate immune response (ie, their own ability to trigger an acute inflammatory response) seems to be negligible [30–33] as long as phage preparations are correctly purified [34]. Conversely, the indirect immunogenicity (ie, triggered by cell lysis) is clearly understudied, emphasizing the significance of this work as the first

comprehensive study assessing ER and cell killing by phages in comparison with antibiotics. We observed that the antibacterial effect of 2 different phages having a proven therapeutic potential [17, 18] was very close to the one obtained with amikacin, in terms of biomass reduction, speed of action, changes in cell morphology, and ER. In addition, when compared to β -lactams,

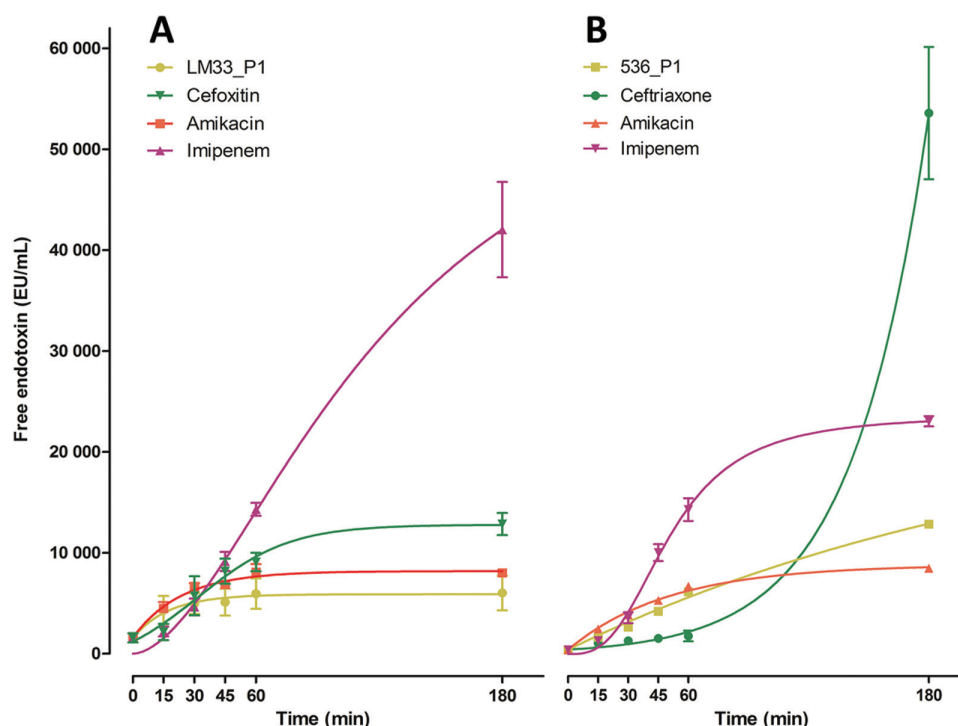


Figure 4. Concentration of free endotoxin released in the culture medium over time by cells exposed to different antibacterial agent. Strain LM33 (A) and strain 536 (B) were cultured in presence of phages (LM33_P1 or 536_P1, multiplicity of infection of 5) or antibiotics (8-fold the minimum inhibitory concentration). The symbols are the means of 2 independent experiments with standard deviation. The curves are nonlinear regressions from these points (see Methods). Abbreviation: EU, endotoxin unit.

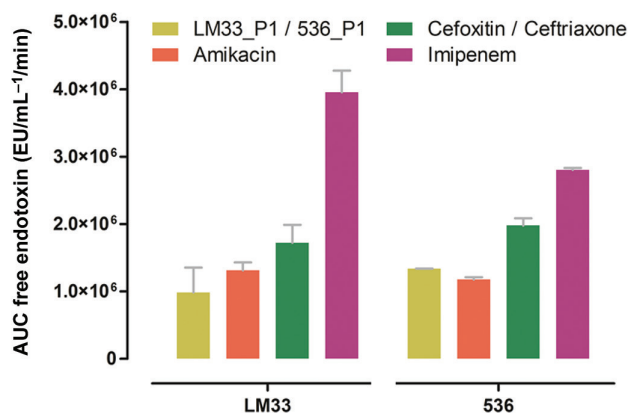


Figure 5. Areas under the concentration of free endotoxin vs time curve (0 to 180 minutes). Strain LM33 (left side) and strain 536 (right side) were cultured in presence of phages (respectively, LM33_P1 and 536_P1, multiplicity of infection of 5) or antibiotics (8-fold the minimum inhibitory concentration). Data are means with standard deviation. Abbreviations: AUC, area under the curve; EU, endotoxin unit.

these 2 phages showed a more rapid bacterial lysis, which was associated with a lower ER.

The mechanisms of action of each of the antibacterial agents tested are different (molecular targets and duration). Phages rely on holins and lysins (peptidoglycan hydrolases) to trigger cell lysis at the end of their infectious cycle [35], while amikacin is a protein synthesis inhibitor binding to the 16S ribosomal RNA of the 30S ribosome subunit. Ceftriaxone (a third-generation cephalosporin), imipenem (a carbapenem), and cefoxitin (a cephamycin) are all β -lactams inhibiting peptidoglycan synthesis by interacting with penicillin-binding proteins (PBPs). More precisely, ceftriaxone (Ro 13-9904) chiefly binds to PBP-3 [36] and induces a high rate of filamentation with delayed lysis and is considered to be a “potent” endotoxin releaser [11, 37]. Imipenem essentially binds to PBP-2, induces spheroplast formation [29], and is considered an “intermediate” endotoxin releaser [11]. Cefoxitin binding is more PBP-1 specific [38] and induces limited filamentation, and could therefore be considered a “weak” endotoxin releaser, like aminoglycosides [11].

Our microscope observations are in agreement with these specific mechanisms of action and the existing data regarding antibiotic-induced changes in cell morphology. Interestingly, phage- and amikacin-treated cells displayed similar inclusion bodies, previously reported when *E. coli* is exposed to aminoglycosides [39, 40]. We did not find in the literature similar intracellular changes in cells submitted to phage predation. However, as these inclusion bodies are related to protein aggregates induced by translation errors and given that phages are known to interfere with bacterial protein synthesis during the viral cycle, those may have the same origin [41]. More interesting is the putative link between these observations and the lowest levels of endotoxin released by either phage- or amikacin- treated cells. By rapidly turning off the cell growth, in contrast to β -lactams, both phages and amikacin avoid an increase in abnormal cell biomass

(eg, with filamentous cells) that will lyse sooner or later, and will release an endotoxin amount proportional to its biomass.

Another key observation is the prompt action of phages. Despite a much more complex and a highly temporally regulated mode of action aiming at hijacking multiple intracellular pathways [42], strictly lytic phages paradoxically appear to be faster than β -lactams in vitro. Among the highly diverse population of phages, this rapidity is a common trait even if important differences exist in terms of cell lysis speed (ranging from <15 minutes to >1 hour, at 37°C [43]). We believe that the 2 phages tested here are particularly good candidates regarding this point.

Several limits have to be discussed in our study. First, our results are related to a limited number of phages and antibiotics. Here, both phages included in this study have favorable kinetic parameters. As the length of the viral cycle is one of the key parameters in the phage pharmacokinetic modeling [44, 45], we cannot rule out the possibility that slower phages could have led to different results. Moreover, we deliberately chose to focus on β -lactams and aminoglycosides because these 2 classes of antibiotics belong to the first-line treatment of many infections in their severe forms (such as pyelonephritis [46]). As “solid value” molecules, they are recommended for the treatment of life-threatening gram-negative infections, especially in neutropenic patients [47, 48]. Other than these valid comparators, what would have been observed if others drugs had been tested (such as quinolones) is open to speculation. Finally, the translation of our results to the in vivo setting could be limited: (1) A possible overestimation of aminoglycosides efficacy may be present in time-kill curve experiments with strain 536 due to antibiotic carryover, as the low number of viable cells required us to plate undiluted samples; (2) in vivo, an additional key player represented by the innate immune system (mainly with polymorphonuclears) is involved in bacterial cell lysis [49]. Additionally, the antibiotic tissue concentrations could be highly variable in the clinical setting among people and fluctuate over time [50]. Thus, periods of time with tissue concentration below the MIC could exist, changing the way cells are lysed.

To conclude, this work provides comforting data regarding the endotoxin-related safety of therapeutically relevant phages, characterized by their low endotoxin release profile and their fast bactericidal effect. An in vivo assessment of the endotoxin release has now to be carried out to confirm and strengthen our findings, which will support further phage therapy development.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

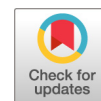
Acknowledgments. We thank Dwayne R. Roach for critical discussions. We warmly thank Yvonne Cloarec for English language revisions and Olivier Sauvage for his helpful contributions using MatLab software.

Financial support. This work was supported by a joint research grant from both Institut Pasteur and Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (Poste d'Accueil pour Praticien Hospitalier).

Potential conflicts of interest. L. D. has received grants and personal fees from Ferring SA. J.-D. R. has received coverage of travel expenses to attend scientific meetings from Fisher & Paykel. All other authors report no potential conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- World Health Organization. Implementation of the global action plan on antimicrobial resistance. WHO GAP AMR Newsletter. Geneva, Switzerland: WHO; 2016.
- Kingwell K. Bacteriophage therapies re-enter clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14:515–6.
- Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 2009; 34:349–57.
- Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine* 2016; 4:124–37.
- Viertel TM, Ritter K, Horz HP. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:2326–36.
- Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011; 1:111–4.
- Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 2007; 170:1435–44.
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119:771–8.
- Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al; MEDIC study. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004; 190:527–34.
- Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180:1584–9.
- Lepper PM, Held TK, Schneider EM, Bölke E, Gerlach H, Trautmann M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 2002; 28:824–33.
- Simpson AJ, Opal SM, Angus BJ, et al. Differential antibiotic-induced endotoxin release in severe melioidosis. *J Infect Dis* 2000; 181:1014–9.
- Prins JM, van Agtmael MA, Kuijper EJ, van Deventer SJ, Speelman P. Antibiotic-induced endotoxin release in patients with gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. *J Infect Dis* 1995; 172:886–91.
- Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW, et al. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery* 2005; 137:639–46.
- Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Bläsi U. Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3817–22.
- Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, et al. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:12879–84.
- Dufour N, Clermont O, La Combe B, et al; ColoColi Group. Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:3072–80.
- Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. *Crit Care Med* 2015; 43:e190–8.
- Henry M, Lavigne R, Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5961–8.
- Craig WA, Ebert SC. Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review. *Scand J Infect Dis Suppl* 1990; 74:63–70.
- Moore RD, Lietman PS, Smith CR. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis* 1987; 155:93–9.
- Turnidge JD. The pharmacodynamics of beta-lactams. *Clin Infect Dis* 1998; 27:10–22.
- Zelenitsky SA, Harding GK, Sun S, Ubhi K, Ariano RE. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:668–74.
- Taccone FS, Hites M, Beumier M, Scolletta S, Jacobs F. Appropriate antibiotic dosage levels in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Curr Infect Dis Rep* 2011; 13:406–15.
- Debarbieux L, Leduc D, Maura D, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis* 2010; 201:1096–104.
- Leber A. 5.14 tests to assess bactericidal activity. In: Leber AL. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2016.
- Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64:357–72.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf. Accessed 15 June 2016.
- Hanberger H, Nilsson LE, Nilsson M, Maller R. Post-antibiotic effect of beta-lactam antibiotics on gram-negative bacteria in relation to morphology, initial killing and MIC. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:927–34.
- Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2874–8.
- McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* 2013; 443:187–96.
- Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, et al. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* 2012; 83:73–121.
- Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A, et al. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 2013; 8:e71036.
- Dufour N, Henry M, Ricard JD, Debarbieux L. Commentary: morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine release in vitro. *Front Microbiol* 2016; 7:1029.
- Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 2014; 52:243–58.
- Wright RB, Makover SD, Telep E. Ro 13-9904: affinity for penicillin binding proteins and effect on cell wall synthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 1981; 34:590–5.
- Gould IM, MacKenzie FM. The response of Enterobacteriaceae to beta-lactam antibiotics—"round forms, filaments and the root of all evil." *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:495–9.
- Fontana R, Cornaglia G, Ligozzi M, Mazzariol A. The final goal: penicillin-binding proteins and the target of cephalosporins. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(suppl 3):34–40.
- Lindner AB, Madden R, Demarez A, Stewart EJ, Taddei F. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:3076–81.
- Bednarska NG, Schymkowitz J, Rousseau F, Van Eldere J. Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology* 2013; 159:1795–806.
- Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13:699–722.
- Chevallereau A, Blasdel BG, De Smet J, et al. Next-generation "omics" approaches reveal a massive alteration of host RNA metabolism during bacteriophage infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 2016; 12:e1006134.
- De Paeppe M, Taddei F. Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages. *PLoS Biol* 2006; 4:e193.
- Cairns BJ, Timms AR, Jansen VA, Connerton IF, Payne RJ. Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000253.
- De Paeppe M, Tournier L, Moncaut E, Son O, Langella P, Petit MA. Carriage of λ latent virus is costly for its bacterial host due to frequent reactivation in monoxenic mouse intestine. *PLoS Genet* 2016; 12:e1005861.
- Gupta K, Hooton TM, Naber KG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 2011; 52:e103–20.
- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41:580–637.
- Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:450–70.
- Craig A, Mai J, Cai S, Jayaseelan S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun* 2009; 77:568–75.
- Blot SI, Pea F, Lipman J. The effect of pathophysiology on pharmacokinetics in the critically ill patient—concepts appraised by the example of antimicrobial agents. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 77:3–11.



Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice

Nicolas Dufour,^{a,b,c} Raphaëlle Delattre,^{a,c,d} Anne Chevallereau,^{a,e*} Jean-Damien Ricard,^{c,f,g} Laurent Debarbieux^a

^aDepartment of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France

^bCentre Hospitalier René Dubos, Service de Réanimation Médico-Chirurgicale, Pontoise, France

^cINSERM, IAME, UMR 1137, Paris, France

^dAP-HP, Hôpital Beaujon, Service d'Anesthésie-Réanimation, Clichy, France

^eUniversité de Paris, Cellule Pasteur, Paris, France

^fAP-HP, Hôpital Louis Mourier, Service de Réanimation Médico-Chirurgicale, Colombes, France

^gUniversité de Paris, IAME, UMR 1137, Paris, France

ABSTRACT Supported by years of clinical use in some countries and more recently by literature on experimental models, as well as its compassionate use in Europe and in the United States, bacteriophage (phage) therapy is providing a solution for difficult-to-treat bacterial infections. However, studies of the impact of such treatments on the host remain scarce. Murine acute pneumonia initiated by intranasal instillation of two pathogenic strains of *Escherichia coli* (536 and LM33) was treated by two specific bacteriophages (536_P1 and LM33_P1; intranasal) or antibiotics (ceftriaxone, cefoxitin, or imipenem-cilastatin; intraperitoneal). Healthy mice also received phages alone. The severity of pulmonary edema, acute inflammatory cytokine concentration (blood and lung homogenates), complete blood counts, and bacterial and bacteriophage counts were determined at early (≤ 12 h) and late (≥ 20 h) time points. The efficacy of bacteriophage to decrease bacterial load was faster than with antibiotics, but the two displayed similar endpoints. Bacteriophage treatment was not associated with overinflammation but in contrast tended to lower inflammation and provided a faster correction of blood cell count abnormalities than did antibiotics. In the absence of bacterial infection, bacteriophage 536_P1 promoted a weak increase in the production of antiviral cytokines (gamma interferon [IFN- γ] and interleukin-12 [IL-12]) and chemokines in the lungs but not in the blood. However, such variations were no longer observed when bacteriophage 536_P1 was administered to treat infected animals. The rapid lysis of bacteria by bacteriophages *in vivo* does not increase the innate inflammatory response compared to that with antibiotic treatment.

KEYWORDS antibiotic resistance, bacteriophage therapy, cytokines, host response, inflammation, innate immunity, lung infection, pneumonia

Among the life-threatening infections caused by multidrug-resistant bacteria, ventilator-associated pneumonia is the most severe and frequent health care-related infection encountered by mechanically ventilated patients in the intensive care unit (1). In this particular context, unconventional antibacterial treatments, such as bacteriophages (phages), must be particularly discrete in terms of immunostimulation to avoid any additional inflammation in the lungs. Indeed, the alveolar epithelium is already highly stressed by mechanical ventilation (2, 3), bacteria, and a patient's critical condition, which provides independent and underestimated sources of inflammation (4).

Citation Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. 2019. Phage therapy of pneumonia is not associated with an overstimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00379-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00379-19>.

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jean-Damien Ricard, jean-damien.ricard@aphp.fr, or Laurent Debarbieux, laurent.debarbieux@pasteur.fr.

* Present address: Anne Chevallereau, ESI, Biosciences, University of Exeter, Cornwall Campus, Penryn, United Kingdom.

Received 19 February 2019

Returned for modification 9 April 2019

Accepted 2 June 2019

Accepted manuscript posted online 10 June 2019

Published 25 July 2019

TABLE 1 Main characteristics of phages LM33_P1 and 536_P1

Characteristic	LM33_P1 (17)	536_P1 (41)
Family	<i>Podoviridae</i>	<i>Myoviridae</i>
Genome size (kbp)	38.9	149.4
Primary host	<i>E. coli</i> LM33 (ESBL, MDR ^a)	<i>E. coli</i> 536 (wild type)
Adsorption constant ^b (ml/min [95% CI])		
K_{a1}	1.2×10^{-8} (1.1 to 1.3×10^{-8})	6.7×10^{-8} (5.0 to 8.4×10^{-8})
K_{a2}		5.1×10^{-9} (4.4 to 5.8×10^{-9})
Latent period ^c (min)	9	19
Eclipse period ^d (min)	7	17
Burst size (PFU [95% CI])	317 (289–345)	176 (161–193)

^aESBL, extended-spectrum β -lactamase; MDR, multidrug resistant.

^bPhage LM33_P1 has a one-step adsorption kinetic, while phage 536_P1 has a two-step kinetic (a fast one followed by a slower one), hence the two different adsorption constants. 95% CI, 95% confidence interval.

^cTime elapsed between cell infection and cell lysis.

^dTime elapsed between cell infection and the detection of the first functional intracellular virions, before cell lysis.

Supported both by years of clinical use in some countries and by an increasing amount of experimental data from independent research teams worldwide, phage therapy is now considered to be a realistic therapeutic strategy to treat multidrug-resistant and severe infections, as recently illustrated by several compassionate treatments (5–8).

Paradoxically, phage therapy safety is underinvestigated despite some clinical feedback (9–12) and *in vivo* and *in vitro* data on many phages (13–16). We recently showed *in vitro* that endotoxin release from two pathogenic strains of *Escherichia coli* lysed by two unrelated virulent phages was lower than that provoked by β -lactams (13). However, knowing if the phage-induced bacterial lysis and/or the phage particle itself could be a proinflammatory stimulus *in vivo* is still a bone of contention.

To address this question, we monitored the effects of two independent phage treatments on the inflammatory response of healthy and infected animals in a murine acute pneumonia model. A reference antibiotic treatment was used as a comparator. We measured the early (10 to 12 h postinfection) and late (20 to 22 h) host responses based on complete blood counts (CBC), lung edema, and results of cytokine assays in both lung homogenates and blood.

RESULTS

Phages 536_P1 and LM33_P1 do not induce a proinflammatory response after their administration in the lungs of healthy uninfected mice. We first examined separately the capacity of phages 536_P1 and LM33_P1 (main characteristics detailed in Table 1) to induce the synthesis of acute-phase inflammatory cytokines (APCyt) in the lungs and blood of noninfected mice.

CBC and cytokine assays in lung homogenates and plasma were performed 7 h ($n = 5$) and 17 h ($n = 5$) following phage administration. We compared these results to those obtained in control mice ($n = 5$) that received phosphate-buffered saline (PBS).

(i) Phage 536_P1. At hour 7 (H7), no significant change in blood cell parameters was observed between the phage and PBS groups (Fig. 1). At hour 17 (H17), phage 536_P1 was associated with mild changes in the CBC, namely, a slight decrease in platelet count (not statistically significant) and a significant increase in neutrophil granulocytes ($P = 0.03$, Fig. 1). No significant increase in concentration of the APCyt was observed in the blood compartment (see Fig. S1 in the supplemental material), whereas in the lungs, the concentrations of antiviral cytokines (gamma interferon [IFN- γ] and IL-12) and chemokines (such as monokine induced by IFN- γ [MIG], monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], and keratinocyte chemoattractant [KC]) displayed increased levels at H17 ($P \leq 0.01$; for all listed cytokines compared to PBS, see Fig. 2 and S2).

(ii) Phage LM33_P1. Pulmonary administration of LM33_P1 by the intranasal route was not associated with significant changes in blood cell counts, except for the lymphocyte count, which was reduced at H7 but returned to the normal level at H17,

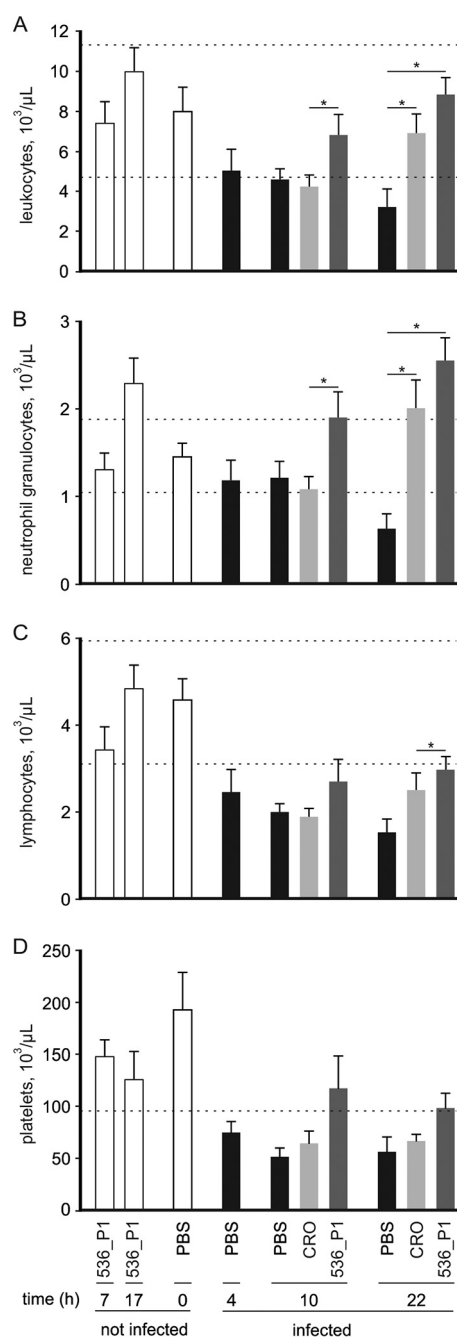


FIG 1 Complete blood counts observed in the experiments with phage 536_P1, ceftriaxone, and strain 536. (A to D) Total leukocytes (A), neutrophil granulocytes (B), lymphocytes (C), and platelets (D) were measured at indicated time points. Mice were infected with strain 536 ($n = 43$), received no treatment (PBS, black bars, $n = 19$), or were treated 4 h postinfection either by ceftriaxone (CRO, light gray, $n = 12$) or phage 536_P1 (dark gray, $n = 12$). Uninfected healthy mice (white bars, $n = 15$) either received phage 536_P1 (assessed 7 and 17 h after administration, $n = 10$) or PBS ($n = 5$). Dotted horizontal lines represent the upper and lower limits of normality for the considered parameter, defined as the 95% confidence interval deduced from the control mice. Data are means with standard errors. *, comparisons performed exclusively within the same time point with a P value of <0.05 .

in comparison with the PBS control group (Fig. S3). No variations in the concentration of the APCyt could be detected, whether it was in the lung or in the blood. Contrary to phage 536_P1, we observed no significant increase in the antiviral cytokine or chemokine concentrations in the lungs or in the blood, regardless of the time points considered (Fig. 3, S5, and S4, respectively).

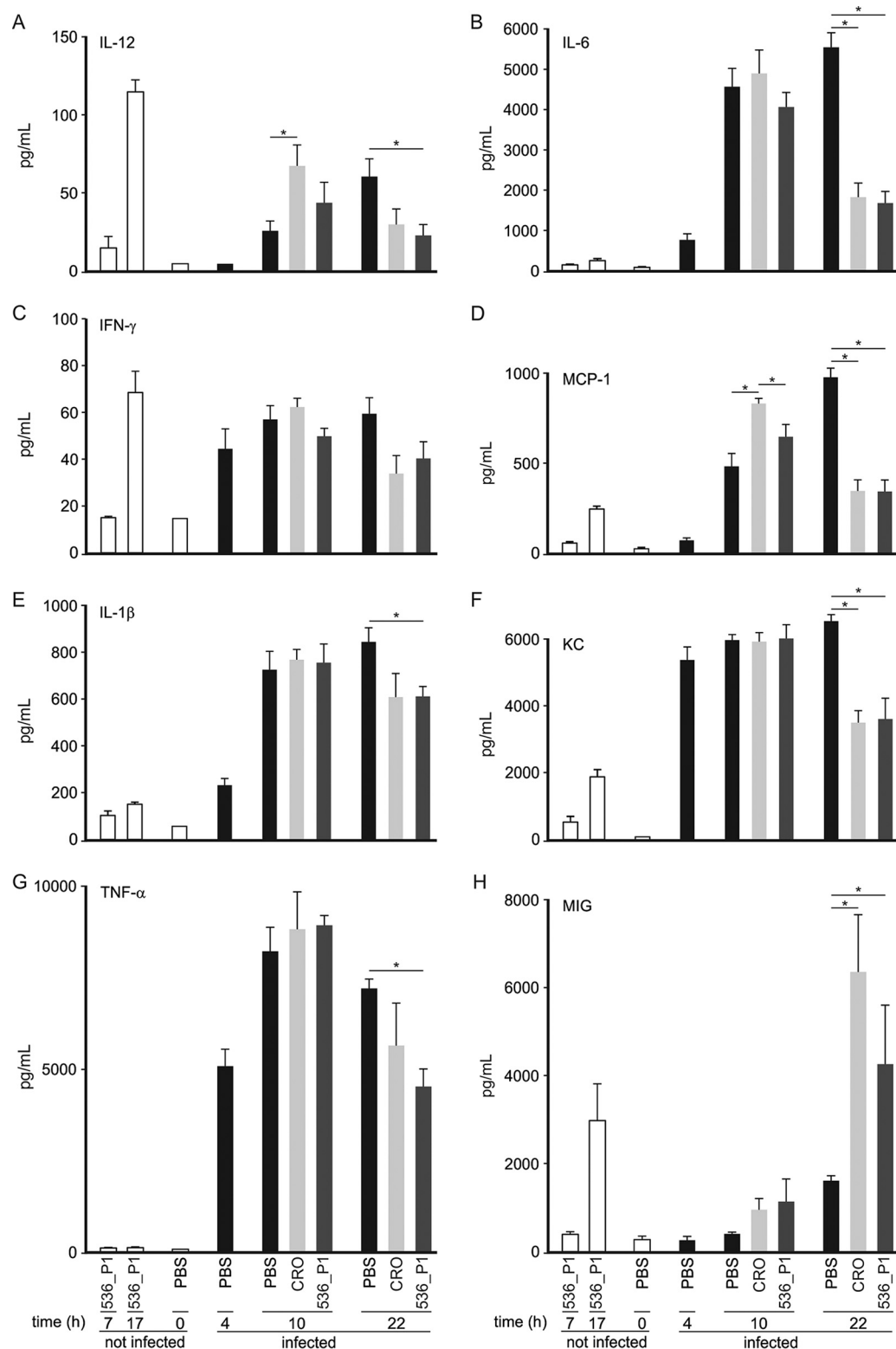


FIG 2 Cytokine concentrations in lung homogenates observed in the experiments with phage 536_P1, ceftriaxone, and strain 536. Mice infected with strain 536 ($n = 35$) received no treatment (PBS, black bars, $n = 15$) or were treated 4 h postinfection either by ceftriaxone (CRO, light gray, $n = 10$) or phage 536_P1 (dark gray, $n = 10$). Uninfected healthy mice (white bars, $n = 15$) either received phage 536_P1 (assessed 7 and 17 h after administration, $n = 10$) or PBS ($n = 5$). Data are means with standard errors. *, comparisons performed exclusively within the same time point with a P value of <0.05 .

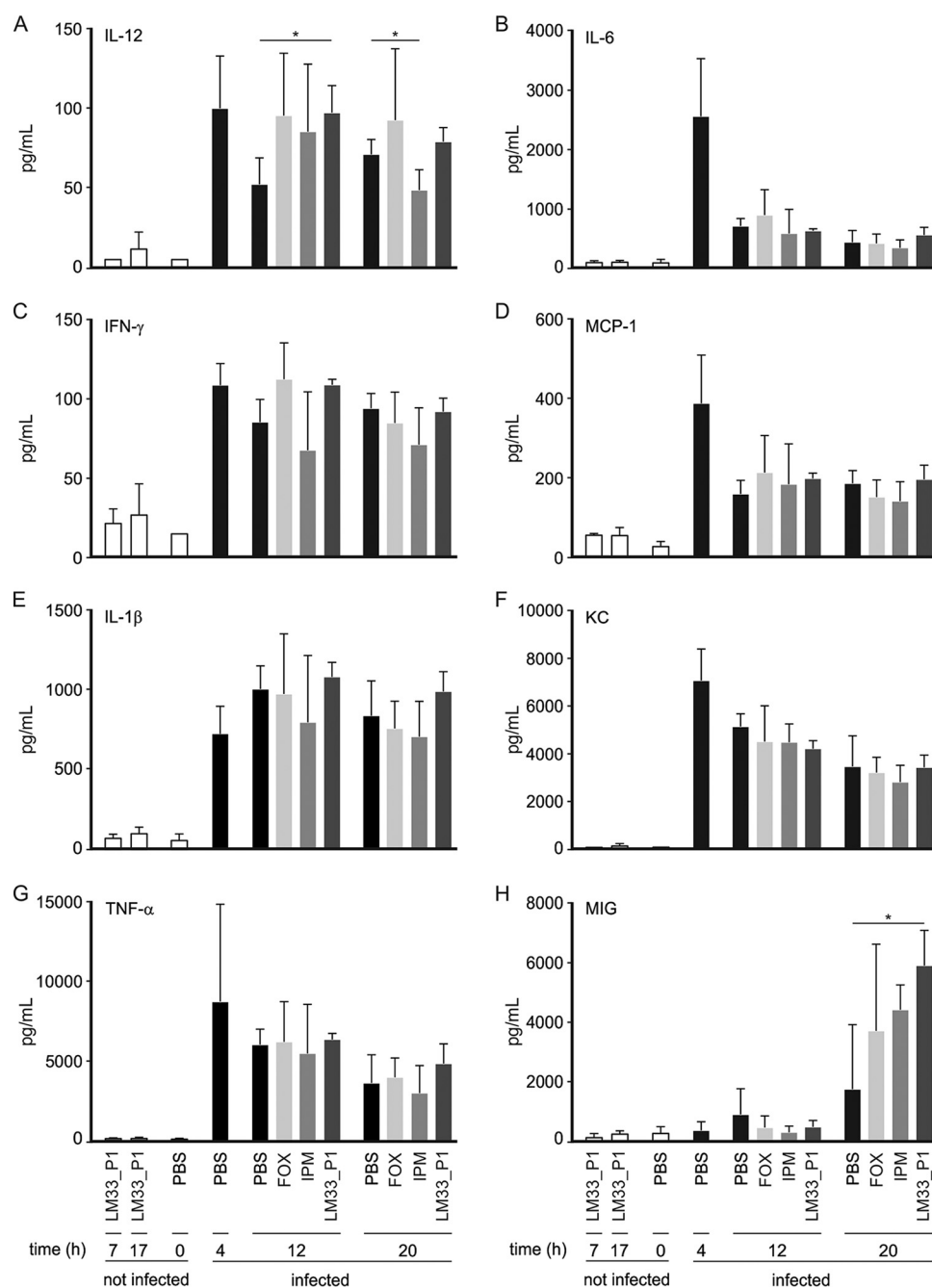


FIG 3 Cytokine concentrations in lung homogenates observed in the experiments with phage LM33_P1, ceftiofur, imipenem-cilastatin, and strain LM33. Mice infected with strain LM33 ($n = 36$) received no treatment (PBS, black bars, $n = 12$) or were treated 4 h postinfection either by ceftiofur (FOX, light gray, $n = 8$), imipenem-cilastatin (IPM, medium gray, $n = 8$), or phage LM33_P1 (dark gray, $n = 8$). Uninfected healthy mice (white bars, $n = 15$) either received phage LM33_P1 (assessed 7 and 17 h after administration, $n = 10$) or PBS ($n = 5$). Data are means with standard errors. *, comparisons performed exclusively within the same time point with a P value of <0.05 .

Additionally, two groups of four healthy mice, each having received a single dose of either 536_P1 or LM33_P1, were closely monitored for 7 days following the intranasal phage administration. Compared to control animals (PBS, $n = 4$), no differences in their behavior and weight evolution were noticed.

Phage 536_P1 clears strain 536 from lungs of infected mice as efficiently as ceftriaxone, and it prevents bacteremia and limits pulmonary inflammatory edema. Following the intranasal instillation of strain 536 ($n = 43$), the bacterial load in

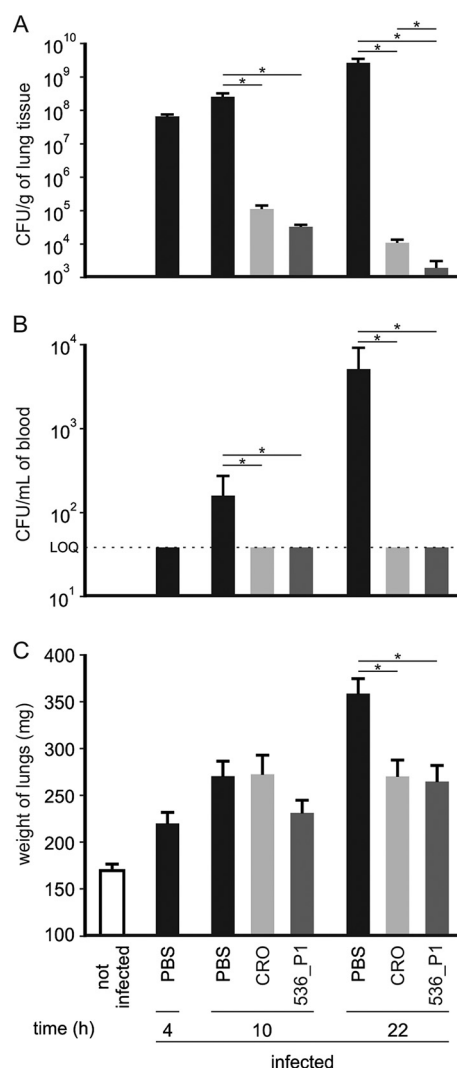


FIG 4 Bacterial loads and lung weights observed in the experiments with phage 536_P1, ceftriaxone, and strain 536. (A to C) Bacterial loads in lung tissue (A) and blood (B) and weight of lungs (C) of mice infected with strain 536 ($n = 43$) were measured at indicated time points. Mice received no treatment (PBS, $n = 19$, black bars) or were treated 4 h postinfection either by ceftriaxone (CRO, light gray, $n = 12$) or phage 536_P1 (dark gray, $n = 12$). Uninfected healthy mice ($n = 7$) are represented by a white bar. LOQ, limit of quantification. Data are means with standard errors. *, comparisons performed exclusively within the same time point with a P value of <0.05 .

the lungs of untreated mice ($n = 19$) continuously increased over time (Fig. 4A). In contrast, phage treatment (PT) (536_P1, $n = 12$) resulted in a decrease in bacterial load that was significantly more pronounced than the decrease observed upon the ceftriaxone treatment ($n = 12$; $P = 0.05$ at H10, $P = 0.01$ at hour 22 [H22]).

Strain 536 has many virulence factors which can favor its dissemination into the blood. Indeed, over the course of the infection, the number of animals with live *E. coli* cells in their blood (limit of detection, 40 CFU/ml) progressively increased over time from 0% (H4) to 40% (H10) and to 83% (H22) with an increasing bacterial load. In contrast, *E. coli* cells could not be detected in the bloodstream of animals treated by phage 536_P1 or ceftriaxone (Fig. 4B).

Concomitant with the severity of lung infection was the development of a pulmonary inflammatory edema that we monitored by weighing the lungs over time. The lung weight from the infected untreated mice was about 2-fold higher than that from noninfected animals at H22 (mean weight, 360 ng versus 171 mg, respectively). Compared to infected untreated animals, both phage and ceftriaxone treatments signifi-

cantly limited the weight increase at late time point (H22; $P < 0.01$; 266 and 271 mg, respectively; Fig. 4C).

Phage 536_P1 and ceftriaxone treatments have a similar beneficial impact in reducing host inflammation over the course of pneumonia. Having shown that phage and antibiotic treatments were both effective, we then investigated the host acute inflammatory response during these treatments.

The infected untreated animals ($n = 19$) displayed a profound disturbance in their CBC characterized by an early, progressive, and marked decrease in leukocytes from H4 postinfection onwards (Fig. 1A). This leukopenia was related to a depletion in neutrophil granulocytes and to a greater extent in lymphocytes (Fig. 1B and C). The same kinetic of decrease was observed with platelets (Fig. 1D). Compared to ceftriaxone treatment ($n = 12$), PT ($n = 12$) was associated with a higher leukocyte count at H10 ($P = 0.04$, Fig. 1A). Similarly, the platelet count decrease in phage-treated mice was less pronounced than in mice treated with ceftriaxone (Fig. 1D).

The infected untreated animals displayed an expected increase in the APCyt (IL-6, IL-1 β , tumor necrosis factor alpha [TNF- α], KC, and MCP-1), especially as the infection progressed over time. The inflammation was essentially present in the lungs while observed to a lower extent in the blood compartment (Fig. 2, S1, and S2). The main findings regarding the acute-phase host response in treated animals can be summarized as follows: (i) ceftriaxone and 536_P1 were both responsible for a marked decrease in the levels of APCyt in the lungs at the late time point, (ii) the extent of this decrease did not differ between ceftriaxone and 536_P1 treatments, (iii) the level of the inflammatory response in the blood was weaker than in the lungs, with a quicker resolution, as attested by very low levels of inflammation at H22, comparable to those observed in the control animals (untreated, uninfected, $n = 5$), and (iv) interestingly, the antiviral cytokine levels at the late time point in 536_P1-treated mice were not higher (significantly lower) than those recorded in uninfected mice receiving the same amount of phage (IFN- γ , 40 versus 69 pg/ml, respectively, $P = 0.03$; IL-12, 23 versus 115 pg/ml, respectively, $P < 0.001$).

A second couple of *E. coli* strain/phage gives rise to similar results regarding inflammation and bacterial control. To test whether our observations could be extended, we performed a second study using another *E. coli* isolate (strain LM33) and a different virus (phage LM33_P1). LM33 (17) is an *E. coli* strain producing extended-spectrum β -lactamase, belonging to the O25b-ST131 clonal complex (18), and isolated from a mechanically ventilated patient who developed a pneumonia. LM33_P1 is one of the most rapid and productive coliphages known to date (17), which could potentially cause a massive endotoxin release associated with the bacterial lysis and therefore lead to excessive proinflammatory stimulation. However, preliminary *in vitro* data do not support such a scenario, as we previously showed that the endotoxin release upon LM33_P1 treatment is actually less important than that upon β -lactam treatment (13).

Because of its lower virulence, the course of the infection and the host response to strain LM33 were anticipated to be different from those with strain 536. Indeed, bacterial growth was controlled in mice infected with 5×10^7 CFU of strain LM33 but untreated ($n = 12$) (Fig. S6A). Consequently, the lung inflammatory edema was weaker than that in the animals infected by strain 536 (compare Fig. 4C and S6B), which overall confirmed the lower virulence of strain LM33 compared to that of strain 536.

We then compared the efficacy of phage LM33_P1 ($n = 8$) to two different antibiotic treatments using cefoxitin ($n = 8$) and imipenem-cilastatin ($n = 8$). We observed, as noted previously (17), that the bacterial load was significantly reduced by PT ($P = 0.02$ at H12 and H20, compared to PBS) to a greater extent than what was observed with antibiotic treatments which turned out to be weakly and slowly active, as they did not lead to a significant decrease in bacterial load ($P \geq 0.1$ compared to PBS, for both antibiotic at H12 and H20; Fig. S6A). We also observed that the lung edema was significantly reduced by PT (compared to PBS) at both early and late time points ($P = 0.02$, see Fig. S6B). This was not observed with the antibiotic treatments, except with cefoxitin at H20 ($P = 0.02$).

Infection with strain LM33, in contrast to 536, was associated with a progressive increase in leukocyte and platelet counts before a return to the initial values at H20 (Fig. S3). Treatment with LM33_P1 was associated with a stable count of leukocytes and platelets at H12 and H20. Similar to antibiotic treatments, LM33_P1 seemed to prevent pathological changes (Fig. S3).

In animals infected by strain LM33, cytokine concentrations were measured only in the lungs due to invalid blood sampling. Compared to strain 536, the infection caused by strain LM33 was associated with earlier and more pronounced pulmonary inflammation with regard to APCyt and chemokines, while it was weaker at late time points (Fig. 2, 3, S2, S5, and S7). The level of inflammation recorded in the lungs from LM33_P1-treated mice was not significantly different from that in untreated animals (Fig. 3 and S5). In a comparison of PT to antibiotic treatments, a two-way analysis of variance (ANOVA) showed that the time was the only independent factor explaining the variability in the concentration of APCyt (IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, and KC), meaning that a given treatment regimen had no significant impact over another one.

DISCUSSION

The vital function of the lung (blood-air interface) can rapidly be jeopardized during a bacterial pneumonia through the direct interaction between bacteria and the immunologically highly reactive epithelial surface. In particular, excessive and uncontrolled inflammation appears to be a key factor in the pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome, a life-threatening disease that may complicate the course of severe pneumonia (19, 20). Therefore, a thorough evaluation of the host immune response during an antibacterial treatment is of prime interest.

The main findings of our work could be summarized as follows: PT efficiently decreases bacterial loads regardless of the virulence and antibiotic resistance profiles of the targeted *E. coli* strains; lung inflammation is differentially affected by each phage and each strain; and the acute cytokine response to phages is localized and phage dependent, has no clinically observable consequence, and is no longer detectable in infected animals nor responsible for immune overstimulation.

We could not find major differences in treatment efficacy between phages and antibiotics. Both decreased the bacterial load in the lungs regardless of the causative pathogen, as well as in the blood of mice infected by strain 536. In each case, both phages acted faster than antibiotics (Fig. 4 and S5). During treatments of strain 536-infected mice, the inflammatory parameters were strongly reduced by phage 536_P1 (as ceftriaxone), while in strain LM33-infected mice, phage LM33_P1 provided a limited decrease despite a faster control of the bacterial load. This limited decrease in inflammatory parameters observed in phage- or antibiotic-treated animals was not different than the one spontaneously observed in untreated animals. This could be interpreted in two ways, as follows: either the animal's immune response is sufficient to clear this low-virulence strain, or the treatment (phage or antibiotic) is responsible for a proinflammatory stimulation compensating for the inflammation reduction usually associated with the treatment. Even though we cannot strictly rule out the latter hypothesis, indirect data (lung weight and decrease in bacterial load) and levels of inflammatory markers from healthy mice exposed to phage LM33_P1 do not support it.

We also observed an unexpected decrease in leukocyte counts during the course of the infection caused by strain 536. Nonetheless, it is known that severe infections can lead to a paradoxical decrease in leukocyte counts, which represents by itself a severity criterion in human infectious diseases (21). Several mechanisms (decrease in production and increase in consumption and migration) are intertwined but seem to be the consequence of immune overstimulation (22). The observed lower inflammation and higher/normal leukocyte counts in treated animals (phages or antibiotics) are in accordance with such an interpretation and provide additional data supporting the safety of phages.

The presence of an antiviral signature in the lungs of healthy uninfected mice following an intranasal instillation of a purified solution of phage 536_P1, but not phage LM33_P1,

raises two comments. First, such triggering of antiviral immunity is phage specific, in agreement with data regarding phage-induced adaptive immunity (23–25). Second, the increase in antiviral cytokine levels was no longer observed when animals were infected and treated by this phage, despite a major increase in phage particle concentration in the lungs resulting from its amplification when killing bacteria (see Fig. S8). To our knowledge, this antiviral response toward a phage particle is reported here for the first time, and its biological (and clinical) significance remains unknown.

Another intriguing result concerns experiments with LM33, where mice treated with phage LM33_P1 displayed a concentration of APCyt in the lung homogenates similar to that with antibiotic treatments, except for monokine induced by interferon- γ (MIG) at H20 postinfection (Fig. 3H and S5). MIG is a member of the CXC chemokine family known to be a T-cell chemoattractant. It is involved in various immunological pathways, including antiviral (eukaryotic viruses) (26–28) and antibacterial immunity, especially when the epithelial interface is involved (29–33). Its expression is mediated by IFN- γ , but not exclusively. The fact that we observed an increased level of MIG in lung homogenates of mice treated by LM33_P1 and not those receiving LM33_P1 solely without a significant increase in IL-12 and IFN- γ tends to favor the hypothesis of a bacterium-dependent stimulation of MIG. However, our model was not designed to fully answer this aspect of the question. Part of the explanation relies on the different mechanisms of bacterial lysis brought into play by a β -lactam antibiotic or a phage, with important consequences in terms of lipopolysaccharide (LPS) (and other antigens) release (kinetic and quantity), cell morphology changes, and death timing, as previously reported for these two phages (13).

These findings underline the complex modulation of the immune response and its different behavior according to the immune situation (dormant or primed) when a viral antigen presentation takes place. Such multifaceted interactions are progressively being highlighted between eukaryotic viruses and the human immune system, as well as the role of virus-associated modulation of the immune response toward nonviral antigens. With strong clinical implications, these interactions are observed, for example, during allograft rejection in solid organ transplantation (34) or during influenza virus-associated bacterial pneumonia (35). Data related to similar interactions regarding prokaryotic viruses (mainly phages) are scarce, but some authors have pointed out a potential immunomodulatory role of phages by themselves (36–38). As recently stressed by Krut et al., our ignorance is substantial regarding the immunological aspects of phage therapy, despite evidence that phages interact with the immune system on top of their synergistic activity with it (25). All these data indicate that phage particles are first able to physically kill bacterial cells; second, they may also be capable of modulating the immune response in a phage-specific manner, with to-date-unknown biological significances but without any adverse observable clinical ones.

Our work has two important limits, as follows: first, only two phages were investigated here, and our results could not be generalized to a greater extent, even if they agree with the general assumption that phages are safe (39). Second, we only investigated the “acute sensing” through a large but limited number of cytokines, and we cannot predict the answer of the adaptive immune response (selection of phage-specific lymphocytes and antibody synthesis) after a few days/weeks.

We conclude that PT does not elicit a proinflammatory response, whereas it is associated with a comparable (if not greater) microbiological control of the infection, overall strengthening arguments in favor of phage therapy. Together with the increasing compassionate use of phages (5–8) and the recent creation of a new center for Innovative Phage Applications and Therapeutics (IPATH) in San Diego, CA (40), our safety data will support further the redeployment of phage therapy to patients.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and phages. Strains 536 (41) and LM33 (17) were grown in lysogeny broth at 37°C. Stock solutions of phages 536_P1 and LM33_P1 were obtained from a high-titer lysate on their respective host (strains 536 and LM33) and purified as described in reference 13. The residual endotoxin content was assessed using an endpoint fluorescent assay based on the *Limulus amoebocyte* lysate

method (EndoZyme II recombinant factor C; Hyglos, Germany); the endotoxin concentrations, measured in the solutions of 536_P1 and LM33_P1 administered to mice, were 0.072 and 0.003 endotoxin units (EU)/ml, respectively.

Antibiotics preparation and doses. Clinical-grade powdered antibiotics (ceftriaxone, cefoxitin, and imipenem-cilastatin) were suspended in sterile LPS-free normal saline (B. Braun, Germany) to reach the adequate concentration and administered subcutaneously. Doses and dosing frequency were decided according to the pharmacodynamics/pharmacokinetic data available in a mouse model (41, 42) and previous experiments (43) to maintain a plasma concentration above the MIC (time-dependent antibiotics), ceftriaxone (Mylan, USA) was administered every 6 h (75 mg/kg per dose, 3 doses), cefoxitin (Hospira, USA) every 2 h (150 mg/kg per dose, 8 doses), and imipenem-cilastatin (Panpharma, France) every 2 h (100 mg/kg imipenem per dose, 8 doses).

Ethics statement. Eight-week-old BALB/cJrj male specific-pathogen-free mice (Janvier, France) were housed in an animal facility at the Institut Pasteur (Paris, France) in accordance with the French and European regulations on the care and protection of the laboratory animals. Animal experiments were approved by the committee on animal experimentation of the Institut Pasteur (approval 10.565) and by the French Ministry of Research (approval 2015-0041). A total of 121 mice was used in the experimental setting. Food and drink were provided *ad libitum*.

Murine model of pneumonia. Mice were infected with 1×10^7 CFU of strain 536 or 5×10^7 CFU of strain LM33. Bacterial suspensions were prepared as needed from exponentially growing cells. Cells were collected by centrifugation, gently washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove culture medium, and resuspended in PBS. Final cell concentrations were determined spectrophotometrically (optical density at 600 nm [OD₆₀₀]) and adjusted with PBS, based on prior experiments where the CFU/OD relationship has been determined for each strain.

The time of infection was defined as H0. Regarding uninfected mice (those receiving only the phage preparation), H0 refers to the time of phage administration. Four hours later (H4), the infected mice received an intranasal administration of 20 μ l of PBS (control and antibiotic groups) or the therapeutic bacteriophage suspensions (20 μ l) with a bacterium-to-phage ratio of 1:100 (calculated for each strain from the CFU inoculated at H0). At H4, the antibiotic treatment was also started; mice received a subcutaneous injection of antibiotic or isotonic saline (control and phage groups), followed by subsequent injections according to the antibiotic dose regimen.

The following time points were chosen for analysis: H0, H4, and H10 (strain 536) or H12 (strain LM33) for early assessment posttreatment, and H22 (strain 536) or H20 (strain LM33) for late assessment. The healthy mice that received phages only were analyzed at H7 (early) and H17 (late). These time points were chosen to match those used during experiments with infected mice and to coincide with the antibiotic injection schedule to limit mouse handling.

Following sacrifice by a lethal intraperitoneal injection of pentobarbital (10 mg/200 μ l), blood was collected by a retro-orbital sampling and instantaneously mixed with 5 μ l of sodium heparinate (5,000 IU/ml; Panpharma, France); the lungs were removed, weighed, and mechanically homogenized (gentleMACS Octo dissociator; Miltenyi Biotec, Germany) in PBS supplemented with protease inhibitors (cOmplete Ultra EDTA-free; Roche, Germany). The lungs and blood were kept on ice and serially diluted within 1 h to count the CFU on selective agar plates (Drigalski medium) and PFU of phage 536_P1 or LM33_P1 using a routine method in triplicate (41). At least 2 independent experiments were performed.

Cytokine assays. Once collected, lung homogenates and blood were centrifuged at $4,000 \times g$ and $1,500 \times g$, respectively, for 10 min at 4°C to pellet either debris or blood cells. The supernatant and plasma were subsequently frozen at -20°C . Cytokines were quantified using a multiplex magnetic bead-based kit (mouse cytokine magnetic 20-plex panel; Life Technologies, USA) relying on the Luminex xMAP technology. Plates were read on a Bio-Plex 200 system (Bio-Rad, USA) (see supplemental material).

Complete blood count. Freshly obtained heparinized blood was analyzed by an automated veterinary hematology cell counter within 30 min following collection (Vet ABC Plus+; scil, Germany) with mouse-dedicated gating parameters.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.03 (GraphPad Software, CA, USA). The normal distribution of all variables was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical tests (Student's *t* test or Mann-Whitney test) were chosen accordingly. Comparisons of proportion were performed using Fisher's exact test. A two-way ANOVA was used to determine how a response (the cytokine variation) is affected by two factors (the time and the treatment). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.00379-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centre d'Immunologie Humaine of the Institut Pasteur for training on the Luminex platform.

This work was supported by two joint research grants from both the Institut Pasteur

and Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (Poste d'Accueil pour Praticien Hospitalier) allocated to N.D. and R.D.

We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Nair GB, Niederman MS. 2015. Ventilator-associated pneumonia: present understanding and ongoing debates. *Intensive Care Med* 41:34–48. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3564-5>.
- Chu EK, Whitehead T, Slutsky AS. 2004. Effects of cyclic opening and closing at low- and high-volume ventilation on bronchoalveolar lavage cytokines. *Crit Care Med* 32:168–174. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000104203.20830.AE>.
- Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. 1997. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 99:944–952. <https://doi.org/10.1172/JCI119259>.
- Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. 2000. Unintended immunomodulation: part I. Effects of common clinical conditions on cytokine biosynthesis. *Shock* 13:333–345. <https://doi.org/10.1097/00024382-200005000-00001>.
- Jennes S, Merabishvili M, Soentjens P, Pang KW, Rose T, Keersebilck E, Soete O, Francois PM, Teodorescu S, Verween G, Verbeken G, De Vos D, Pirnay JP. 2017. 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* 21:129. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1709-y>.
- Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. 2017. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e00954-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>.
- Pirnay JP, Verbeken G, Ceyssens PJ, Huys I, De Vos D, Ameloot C, Fauconnier A. 2018. The magistral phage. *Viruses* 10:E64. <https://doi.org/10.3390/v10020064>.
- Fish R, Kutter E, Wheat G, Blasdel B, Kutateladze M, Kuhl S. 2018. Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials. *Methods Mol Biol* 1693:159–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_14.
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1:66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
- Bruttin A, Brussow H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2874–2878. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005>.
- McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, Krause L, Bibiloni R, Schmitt B, Reuteler G, Brüssow H. 2013. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* 443:187–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.022>.
- Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawelczyk Z, Rogóż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A. 2012. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res* 83:73–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7>.
- Dufour N, Delattre R, Ricard JD, Debarbieux L. 2017. The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than beta-lactams. *Clin Infect Dis* 64:1582–1588. <https://doi.org/10.1093/cid/cix184>.
- Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A, Owczarek B, Wojas-Turek J, Kicielińska J, Rossowska J, Pajtasz-Piasecka E, Hodyra K, Macgoniuk K, Rzewucka K, Kopciuch A, Majka T, Letarov A, Kulikov E, Maciejewski H, Górski A. 2013. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 8:e71036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071036>.
- Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. 2017. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. *Cell Host Microbe* 22:38–47.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>.
- Barr JJ. 2017. A bacteriophages journey through the human body. *Immunol Rev* 279:106–122. <https://doi.org/10.1111/immr.12565>.
- Dufour N, Clermont O, La Combe B, Messika J, Dion S, Khanna V, Denamur E, Ricard JD, Debarbieux L, ColoColi G. 2016. Bacteriophage LM33_P1, a fast-acting weapon against the pandemic ST131-O25b:H4 *Escherichia coli* clonal complex. *J Antimicrob Chemother* 71:3072–3080. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw253>.
- Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27:543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>.
- Han S, Mallampalli RK. 2015. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *J Immunol* 194:855–860. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402513>.
- Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, Postlethwaite A. 1995. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108:1303–1314. <https://doi.org/10.1378/chest.108.5.1303>.
- Reilly JP, Anderson BJ, Hudock KM, Dunn TG, Kazi A, Tommasini A, Charles D, Shashaty MG, Mikkelsen ME, Christie JD, Meyer NJ. 2016. Neutropenic sepsis is associated with distinct clinical and biological characteristics: a cohort study of severe sepsis. *Crit Care* 20:222. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1398-y>.
- Goyette RE, Key NS, Ely EW. 2004. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. *Semin Respir Crit Care Med* 25:645–659. <https://doi.org/10.1055/s-2004-860979>.
- Dąbrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, Kazmierczak Z, Letarov A, Gorski A. 2014. Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol* 88:12551–12557. <https://doi.org/10.1128/JVI.02043-14>.
- Shiley JR, Comfort KK, Robinson JB. 2017. Immunogenicity and antimicrobial effectiveness of *Pseudomonas aeruginosa* specific bacteriophage in a human lung in vitro model. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:7977–7985. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8504-1>.
- Krut O, Bekeredjian-Ding I. 2018. Contribution of the immune response to phage therapy. *J Immunol* 200:3037–3044. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701745>.
- Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 105:985–993. <https://doi.org/10.1172/JCI9232>.
- Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP. 2007. CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J Virol* 81:1241–1250. <https://doi.org/10.1128/JVI.01937-06>.
- Salazar-Mather TP, Hokeness KL. 2006. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 303:29–46.
- Yung SC, Murphy PM. 2012. Antimicrobial chemokines. *Front Immunol* 3:276. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00276>.
- Reid-Yu SA, Tuinema BR, Small CN, Xing L, Coombes BK. 2015. CXCL9 contributes to antimicrobial protection of the gut during citrobacter rodentium infection independent of chemokine-receptor signaling. *PLoS Pathog* 11:e1004648. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004648>.
- Park MK, Amichay D, Love P, Wick E, Liao F, Grinberg A, Rabin RL, Zhang HH, Gebeyehu S, Wright TM, Iwasaki A, Weng Y, DeMartino JA, Elkins KL, Farber JM. 2002. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol* 169:1433–1443. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1433>.
- Eliasson M, Frick IM, Collin M, Sorensen OE, Björck L, Egesten A. 2007. M1 protein of *Streptococcus pyogenes* increases production of the antibacterial CXC chemokine MIG/CXCL9 in pharyngeal epithelial cells. *Microb Pathog* 43:224–233. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.06.007>.
- Egesten A, Eliasson M, Johansson HM, Olin AI, Morgelin M, Mueller A, Pease JE, Frick IM, Björck L. 2007. The CXC chemokine MIG/CXCL9 is

- important in innate immunity against *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* 195:684–693. <https://doi.org/10.1086/510857>.
34. Martin-Gandul C, Mueller NJ, Pascual M, Manuel O. 2015. The impact of infection on chronic allograft dysfunction and allograft survival after solid organ transplantation. *Am J Transplant* 15:3024–3040. <https://doi.org/10.1111/ajt.13486>.
 35. Robinson KM, Kolls JK, Alcorn JF. 2015. The immunology of influenza virus-associated bacterial pneumonia. *Curr Opin Immunol* 34:59–67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.02.002>.
 36. Górski A, Jończyk-Matysiak E, Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Borysowski J. 2018. Therapeutic potential of phages in autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol* 192:1–6. <https://doi.org/10.1111/cei.13092>.
 37. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. 2012. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res* 83: 41–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00002-5>.
 38. Van Belleghem JD, Clement F, Merabishvili M, Lavigne R, Vaneechoutte M. 2017. Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Sci Rep* 7:8004. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08336-9>.
 39. Loc-Carrillo C, Abedon ST. 2011. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 1:111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>.
 40. Servick K. 2018. U.S. center will fight infections with viruses. *Science* 360:1280–1281. <https://doi.org/10.1126/science.360.6395.1280>.
 41. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. 2015. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pneumonia with bacteriophages. *Crit Care Med* 43:e190–e198. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000968>.
 42. Lepeule R, Ruppe E, Le P, Massias L, Chau F, Nucci A, Lefort A, Fantin B. 2012. Cefoxitin as an alternative to carbapenems in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* harboring CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 1376–1381. <https://doi.org/10.1128/AAC.06233-11>.
 43. Soubirou JF, Rossi B, Couffignal C, Ruppe E, Chau F, Massias L, Lepeule R, Mentre F, Fantin B. 2015. Activity of temocillin in a murine model of urinary tract infection due to *Escherichia coli* producing or not producing the ESBL CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 70:1466–1472. <https://doi.org/10.1093/jac/dku542>.

Les bactériophages en pratique clinique : suivez le guide !

De l'approvisionnement à l'administration

Version Janvier 2021

Anthia MONRIBOT¹, Raphaëlle DELATTRE^{2,3}, Nicolas DUFOUR^{3,4}, Camille d'HUMIERES⁵, Nathalie PONS-KERJEAN¹, Julie BATAILLE¹

¹ Pharmacie à usage intérieur (PUI), Hôpital Beaujon AP-HP, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy

² Service d'anesthésie-réanimation, Hôpital Beaujon AP-HP, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy

³ Institut Pasteur, Department of Microbiology, Molecular Biology of Gene in Extremophiles, 75015 Paris

⁴ Service de Réanimation Médico-chirurgicale, Centre Hospitalier René Dubos, 95300 Pontoise

⁵ Laboratoire de bactériologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard AP-HP, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris

Avec le soutien du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM)



Table des matières

I	RESUME	4
II	INTRODUCTION	8
III	QUELQUES DONNEES GENERALES	9
III.1	LES BACTERIOPHAGES : DEFINITION	9
III.2	LE STATUT REGLEMENTAIRE DES BACTERIOPHAGES	11
III.3	LES MODALITES DE MISE A DISPOSITION DES SUSPENSIONS-LYOPHILISATS DE BACTERIOPHAGES	12
III.4	LA REGLEMENTATION RELATIVE A LA PRODUCTION ET LE CONTROLE DE LA QUALITE DES SUSPENSIONS-LYOPHILISATS DE BACTERIOPHAGES	14
III.5	LES DONNEES CLINIQUES D'EFFICACITE.....	15
III.6	SECURITE DE L'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BACTERIOPHAGES	17
III.7	LES DIFFERENTES SOURCES DE BACTERIOPHAGES THERAPEUTIQUES EN FRANCE ET EN EUROPE.....	20
IV	LES MODALITES DE L'ACCES A LA PHAGOTHERAPIE EN FRANCE	23
IV.1	LES SITUATIONS CLINIQUES POTENTIELLEMENT ELIGIBLES A UN TRAITEMENT PAR BACTERIOPHAGES	23
IV.2	INFORMATION DE L'ANSM QUANT AU PROJET D'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BACTERIOPHAGES ..	24
IV.3	DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES BACTERIENNES AUX BACTERIOPHAGES ET DE L'EFFICACITE A FORMER DES PLAGES DE LYSE	25
IV.4	ÉVALUATION DE LA QUALITE PHARMACEUTIQUE DES MATIERES PREMIERES DE BACTERIOPHAGES ET LES ETAPES DE PREPARATION – CONTROLE DE LA QUALITE PHARMACEUTIQUE DES PREPARATIONS TERMINEES	29
IV.5	ÉVALUATION DU PROJET D'ADMINISTRATION DE BACTERIOPHAGES THERAPEUTIQUES	37
IV.6	ASSOCIATION THERAPEUTIQUE BACTERIOPHAGES - ANTIBIOTIQUES	38
V	LES MODALITES PRATIQUES D'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES	39
V.1	LE TRANSPORT ET LE STOCKAGE DES DIFFERENTES FORMES DE BACTERIOPHAGES.....	39
V.2	LES MODALITES DE MANIPULATION DES BACTERIOPHAGES	39
V.3	LES MESURES D'HYGIENE ET DE PROTECTION LIEES A LA MANIPULATION DES PREPARATIONS DE BACTERIOPHAGES	42
V.4	LES MODALITES D'ADMINISTRATION DES BACTERIOPHAGES	43
V.5	LE FINANCEMENT DES PREPARATIONS DE BACTERIOPHAGES	43
VI	CONCLUSION	45
VII	LISTE DES ABREVIATIONS.....	47
VIII	DEFINITION DES TERMES UTILISES	48
IX	BIBLIOGRAPHIE	51
ANNEXE 1.....	57	
ANNEXE 2.....	62	
1.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION CUTANEE.....	62
2.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION ORL CHRONIQUE.....	66
3.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION URINAIRE	68
4.	ESSAI CLINIQUE CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN	69
5.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION DIGESTIVE	70
ANNEXE 3.....	74	
ANNEXE 4.....	75	
ANNEXE 5.....	76	
LISTE DES TABLEAUX	79	
LISTE DES FIGURES	79	

Nous tenons à remercier le Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM) pour leur soutien dans ce projet.

Nous tenons à remercier la Direction Produits en charge des vaccins, des médicaments anti-infectieux, en hépato-gastroentérologie, en dermatologie, de thérapie génique et des maladies métaboliques rares (INFHEP), pôle MALINF de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé pour leur aide à la rédaction de ce document.

Nous remercions sincèrement le Professeur Jean-Hugues Trouvin pour son expertise dans les domaines de la réglementation et de la législation pharmaceutique, et ses multiples relectures.

Nous remercions également le Docteur Gilles Leboucher pour la relecture du document.

AVERTISSEMENT

Ce guide n'a pas pour but de se substituer au contenu d'un dossier d'AMM ou aux évaluations au cas par cas de l'ANSM. Il sera amené à évoluer selon la législation, les recommandations européennes et françaises, les retours d'expériences des praticiens et les résultats des études précliniques et cliniques.

I Résumé

La phagothérapie est l'usage médical des bactériophages, virus qui possèdent la particularité d'infecter exclusivement les bactéries. Les bactériophages ont des spectres étroits : ils sont spécifiques d'une espèce bactérienne voire de quelques souches et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce (1–4). Les bactériophages sont capables de présenter principalement deux types de cycles infectieux :

- **le cycle lytique**, propre aux **bactériophages virulents**, qui détruit la bactérie en détournant la machinerie bactérienne au profit de la synthèse protéique et génomique virale ;
- **le cycle lysogénique**, propre aux **bactériophages tempérés**. Ces virus présentent la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien, sans lyser systématiquement la bactérie. Ils peuvent donc conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non, comme des facteurs de virulence par exemple (1–4).

La phagothérapie se base uniquement sur l'utilisation de bactériophages virulents. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique, il est donc recommandé de vérifier l'absence de bactériophages tempérés dans le produit final, autrement dit la matière première-principe actif car ils sont de potentiels vecteurs de gènes indésirables (gènes de virulence ou d'antibiorésistance) (1–4).

Il existe différentes sources de bactériophages en France et en Europe (cf. III.7, liste non exhaustive). Les bactériophages sont disponibles sous forme de suspension ou de lyophilisat.

A ce jour, **l'utilisation des bactériophages est empirique, elle est principalement basée sur un rationnel pharmacodynamique d'efficacité**. Malgré leur large utilisation en Europe de l'Est, les données cliniques sont limitées. Des études expérimentales menées chez l'animal ont notamment démontré une efficacité des bactériophages pour le traitement d'infections bactériennes principalement respiratoires, cutanées et digestives induites par *P. aeruginosa*, *E. coli* ou *S. aureus* (5). La sécurité de la phagothérapie a également été démontrée dans des travaux précliniques et cliniques (6,7). Cependant, à ce jour, un nombre limité d'essais cliniques utilisant des bactériophages et conformes aux standards actuels en termes de recherche biomédicale ont été conduits : 1 mené chez des sujets sains, 4 menés chez des sujets malades (8–12). En France, **l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a encadré la mise à disposition de bactériophages** pour une quinzaine de patients depuis 2016. En majorité, il s'agissait d'infections ostéo-articulaires pour lesquelles des administrations locales *in situ* ont été réalisées (13).

L'Agence européenne du médicament (EMA) a admis en 2015 que le **traitement par les bactériophages s'inscrit dans le cadre réglementaire européen applicable aux médicaments biologiques, tel que défini dans la directive 2001/83/CE** du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 modifiée par la directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (14–16). Dans la même dynamique, l'ANSM a admis lors d'une réunion du comité scientifique spécialisé temporaire (CSST) sur la phagothérapie du 24/03/2016 que les **bactériophages relevaient de la**

réglementation applicable aux médicaments (17). Leur mise à disposition sera donc réalisée selon les statuts définis dans l'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique (CSP) (18).

Dans la mesure où **aucun développeur-industriel n'a introduit de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et en Europe** pour des suspensions-lyophilisats de bactériophages et dans un contexte de sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, **l'ANSM a encadré et autorisé la mise à disposition de suspensions-lyophilisats de bactériophages à titre compassionnel**. A ce jour, **la production-fabrication des suspensions-lyophilisats de bactériophages n'est pas réalisée selon un procédé industriel standardisé** à même de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces produits. **Les suspensions-lyophilisats de bactériophages produites** (à la demande ou « en série ») pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme **ne peuvent donc être considérées comme des médicaments au sens de la spécialité pharmaceutique**. Dans ce contexte, la **mise à disposition des suspensions-lyophilisats ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel**.

Dans ce dernier cas, il s'agira d'une mise à disposition :

- dans le cadre d'une **Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative** ;
- selon le **statut des matières premières pharmaceutiques, utilisées pour réaliser une préparation magistrale** (Annexe 1). Les **pharmacies à usage intérieur (PUI) seront donc en charge de la préparation**, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique (reconstitution, dilution) de ces matières premières.

Lors d'une réunion du CSST de 2016 sur la phagothérapie à l'initiative de l'ANSM, **il a été acté que la prescription, la dispensation ainsi que l'administration de suspensions de bactériophages doivent être effectuées au sein d'un établissement de santé** (17).

Ainsi, une demande de bactériophages ne peut être **initiée que par un médecin hospitalier** et les **suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une PUI** d'un établissement de santé. L'administration des bactériophages sera réalisée sous la responsabilité du médecin prescripteur en charge du patient et du pharmacien hospitalier.

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus de mise à disposition des bactériophages. Une **discussion collégiale** doit ainsi être menée autour du cas afin d'analyser **l'histoire clinique et thérapeutique du patient**, le **rapport bénéfice/risque d'une thérapie par bactériophages**.

En 2016, le CSST a décidé consensuellement des **critères justifiant une situation de besoin, applicable à tout type d'infection et justifiant un accès aux bactériophages** :

- **un pronostic vital engagé** ou un pronostic fonctionnel menacé ;
- une **situation d'impasse thérapeutique** (« situation de sauvetage ») ;
- une **infection monomicrobienne**.

Par ailleurs, au regard des données à ce jour limitées permettant de sous-tendre l'utilisation des bactériophages, **il a été acquis la nécessité de disposer des données d'efficacité *in vitro*, notamment d'un phagogramme**, avant la décision d'une mise sous traitement. **Le phagogramme a pour objectif** de tester **la sensibilité de la souche bactérienne** vis-à-vis d'un ou de plusieurs bactériophages candidats qui sont détenus dans une phagothèque (17).

Néanmoins, l'expérience clinique sur les bactériophages acquise au cours de ces 2 dernières années ont fait évoluer les indications de la phagothérapie. Ainsi, des cas pratiques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages ont été définis :

- **une résistance bactérienne aux antibiotiques** ;
- une infection dont le germe reste sensible à certains antibiotiques mais dont la **morbidité liée au traitement** n'est pas acceptable (néphrotoxicité, allergie, etc.) ;
- **une inefficacité clinique des antibiotiques** : infection difficile à éradiquer avec un passage à la chronicité.

De plus, **des discussions devront être menées afin de déterminer la voie d'administration, la composition de la solution en principe actif et excipients** (concentration, nombre de bactériophages différents, etc.), **la forme galénique ainsi que les dispositifs médicaux** (DM) utilisés lors de l'administration (en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques et techniques des DM ainsi que les interactions potentielles entre ces DM et les bactériophages). La voie d'administration devra permettre de concentrer les bactériophages au niveau du site infecté tout en restant compatible avec les caractéristiques pharmaceutiques des cocktails de bactériophages. Ainsi, l'administration locale de bactériophages pourrait être considérée comme la plus sécuritaire selon les données disponibles avec l'avantage de connaître la quantité de bactériophages délivrée au site de l'infection. Lors de la réunion du CSST de 2019, il a été admis par l'ensemble des experts que la voie orale était exclue, ainsi que la voie intrathécale *a priori* (13).

Le pharmacien hospitalier est en charge de l'évaluation de la qualité pharmaceutique de la matière première. Il convient de rappeler que les contrôles principaux sur la qualité pharmaceutique des matières premières-substances actives de bactériophages doivent être réalisés par le fabricant-industriel-développeur, conformément à la réglementation en vigueur. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique le **bulletin de contrôle de la matière première fourni par le fabricant**, pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation de cette substance active chez l'Homme. Les informations et contrôles indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières-substances actives, qui doivent être détaillés sur le bulletin de contrôle, sont listés dans ce guide. Après avoir validé la qualité pharmaceutique de la matière première, **le pharmacien hospitalier réalisera les étapes de préparation** (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration)

conformément aux **Bonnes Pratiques de Préparation (BPP)** au sein de la PUI. Il réalisera également un **contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale (ou hospitalière) terminée de bactériophages**, afin de permettre son administration chez l'Homme (19).

II Introduction

La phagothérapie est l'usage médical des bactériophages, virus qui possèdent la particularité d'infecter exclusivement les bactéries. Mise en œuvre dès les années 1930, cette thérapeutique a été abandonnée en Occident au profit de l'antibiothérapie. Néanmoins, elle a continué à être pratiquée en Europe de l'Est. L'utilisation des bactériophages émerge de nouveau dans l'arsenal thérapeutique comme une alternative potentielle à l'antibiothérapie (ou en complément de cette dernière), au regard des situations d'impasses thérapeutiques, compte tenu de la multi-résistance croissante, des tensions d'approvisionnement et d'un besoin non satisfait en nouveaux antibiotiques.

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

Actuellement, il n'existe pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et en Europe pour des bactériophages qui pourraient être utilisés comme médicament (au sens de la spécialité pharmaceutique selon la législation française) dans des indications en infectiologie. Les recommandations spécifiques européennes sur le développement des bactériophages en termes de production et de qualité pharmaceutique (contrôle qualité) sont peu nombreuses. Le cadre réglementaire actuel doit donc s'adapter aux situations cliniques particulières (situation d'urgence, patients en situation d'impasse thérapeutique, pronostic vital et fonctionnel engagé) et aux spécificités des cocktails de bactériophages « sur mesure » (approche personnalisée).

Dans ce contexte et face aux interrogations et sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, nous avons souhaité élaborer un guide pratique sur l'utilisation thérapeutique des bactériophages. L'objectif de ce travail est double :

- informer sur l'état actuel des connaissances relatives à cette thérapeutique et à sa réglementation ;
- encadrer l'utilisation des bactériophages en décrivant chacune des étapes, de la production à l'administration dans le but de garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité de cette thérapeutique.

III Quelques données générales

III.1 Les bactériophages : définition

Les bactériophages sont des virus infectant spécifiquement les bactéries et ne possédant pas la capacité d'infecter les cellules eucaryotes (1,3,4,20). Les bactériophages ont des spectres étroits : ils sont spécifiques d'une espèce bactérienne voire de quelques souches et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce. Ils sont présents en grande quantité là où des bactéries sont présentes. Les bactériophages sont donc présents dans l'ensemble de la biosphère : eaux, sols, plantes, alimentation, sur la peau, dans notre tube digestif, sur nos muqueuses (21–23). La grande majorité (96%) des bactériophages appartient à l'ordre des *Caudovirales* (virus avec une queue) et sont le plus souvent des virus à ADN double brin, non enveloppés. Les bactériophages d'intérêt pour la phagothérapie appartiennent très majoritairement à trois familles : *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae* (1,20,24).

Comme illustré sur la **Figure 1**, ils sont constitués :

- d'une capsid protéique protégeant leur génome (ADN-ARN) ;
- d'une queue de longueur variable ;
- de fibres de queue permettant l'interaction du virus avec les récepteurs spécifiques de l'hôte.

Ils mesurent en moyenne entre 24 et 200 nanomètres (24).

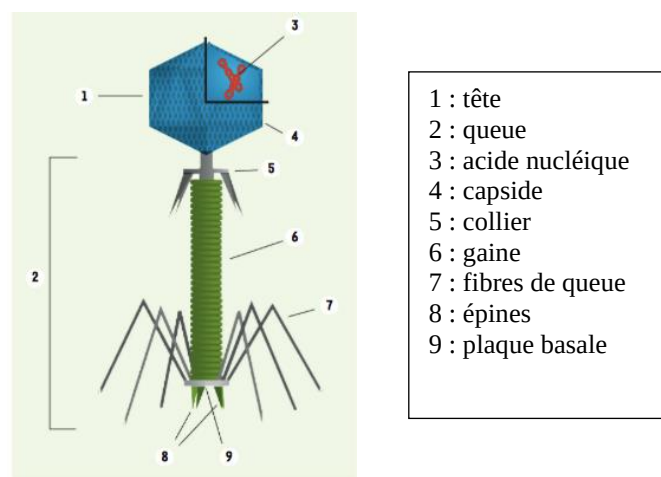


Figure 1. Structure du bactériophage T4 (1)

Les bactériophages sont capables de présenter principalement deux types de cycles infectieux en fonction des informations codées dans leur génome et de l'état métabolique des cellules infectées comme illustré dans la **Figure 2**. (1,3,4,20).

Les bactériophages virulents détruisent la bactérie en détournant la machinerie bactérienne au profit de

la synthèse protéique et génomique virale. Les protéines structurales virales et le génome viral sont produits en grande quantité, respectivement assemblées et encapsidées, aboutissant ainsi à la formation de virions matures. Au terme de ce **processus lytique**, la lyse bactérienne va libérer plusieurs dizaines de virions. Ce phénomène d'amplification au niveau du site infectieux est une propriété tout à fait originale de la phagothérapie par rapport à l'antibiothérapie (1–4).

Le cycle lysogénique est propre aux **bactériophages tempérés**. Ces derniers ont la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien, sans altérer la viabilité bactérienne. Le génome viral est répliqué à chaque division cellulaire et transmis à la descendance. Ces bactériophages peuvent donc conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non, comme des facteurs de virulence par exemple. Ils peuvent rester quiescents très longtemps, mais peuvent en cas de stress physiologique (irradiation UV, mytomycine, déplétion énergétique du milieu), s'exciser du génome bactérien et débiter un cycle infectieux lytique (1–4).

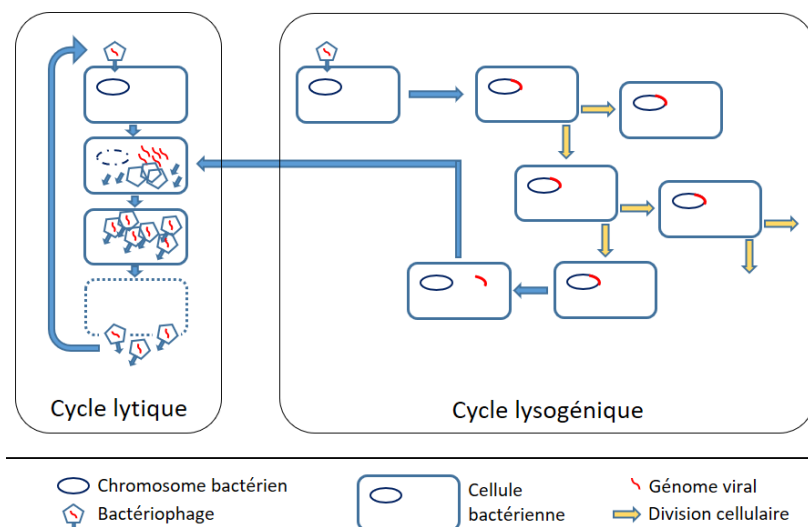


Figure 2. Les principaux cycles infectieux des bactériophages (2)

Ainsi, la phagothérapie, de par son mode d'action attendu, impose l'utilisation exclusive de bactériophages virulents pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique, **il est en effet recommandé de vérifier l'absence de bactériophages tempérés dans la suspension-lyophilisat de bactériophages produit(e), autrement dit la matière première-principe actif** (via l'analyse du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages de la suspension), car ils sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le patient (gène de virulence ou d'antibiorésistance). Cette élimination des bactériophages tempérés est notamment

faite en vérifiant l'absence de possibilité d'intégration du génome du bactériophage au génome bactérien (le mode opératoire est détaillé au chapitre IV.4.b).

III.2 Le statut réglementaire des bactériophages

L'Agence européenne du médicament (EMA) a organisé un colloque sur les bactériophages le 8 juin 2015 (« *Workshop on the therapeutic use of bacteriophages* ») avec pour objectif d'échanger sur les problématiques liées aux développements des traitements par bactériophages. Au cours de cette journée, le cadre réglementaire, les aspects qualité ainsi que l'état d'avancement du développement clinique ont été discutés (16).

Il a été admis lors de ce colloque que le **traitement par les bactériophages s'inscrit dans le cadre réglementaire européen applicable aux médicaments biologiques, tel que défini dans la directive 2001/83/CE** du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 modifiée par la directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Cette directive impose qu'une AMM soit délivrée (14,15). La présente directive s'applique aux médicaments à usage humain, plus précisément aux spécialités pharmaceutiques, destinés à être mis sur le marché dans les États membres et préparés industriellement ou fabriqués selon une méthode dans laquelle intervient un processus industriel (25). Conformément à celle-ci, le dossier d'AMM doit comporter des données pharmaceutiques, précliniques et cliniques détaillées. Il a par ailleurs été confirmé que les bactériophages non génétiquement modifiés ne répondaient pas, de par leur mode d'action et leur origine, à la classification de médicament de thérapie innovante (MTI) (16).

Dans la même dynamique, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a créé le 24/03/2016 un comité scientifique spécialisé temporaire sur la phagothérapie (CSST)¹. Il a été admis lors de ce CSST que les **bactériophages relèvent de la réglementation applicable aux médicaments** (14,15,17).

Dans la mesure où **aucun développeur - industriel n'a introduit une demande d'AMM** en France et en Europe pour des suspensions-lyophilisats de bactériophages et dans un contexte de sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, l'ANSM a encadré et autorisé la mise à disposition de suspensions-lyophilisats de bactériophages à titre compassionnel, selon des procédures dérogatoires, sous le statut de matières premières (principe actif), pouvant être utilisées comme composants d'une préparation magistrale. A ce jour, la production-fabrication des suspensions-lyophilisats de bactériophages

¹http://ansm.sante.fr/content/download/91159/1144681/version/1/file/CR_CSST_Phagothérapie_CSST20161101_3_24-03-2016.pdf.

n'est pas réalisée selon un procédé industriel, permettant de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces produits. Il s'agit d'une production pouvant être qualifiée « d'expérimentale ». Les suspensions-lyophilisats de bactériophages produites (à la demande ou « en série ») pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme, ne peuvent donc être considérées comme des médicaments au sens de la spécialité pharmaceutique, mais peuvent être mises à disposition selon le statut de matière première (25). Les **pharmacies à usage intérieur (PUI) seront en charge de la préparation**, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique : reconstitution, dilution de ces matières premières.

III.3 Les modalités de mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages

La mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages sera réalisée selon les statuts définis dans l'article L.5111-1 du code de la santé publique (CSP) (18).

Lors du CSST de 2016 sur la phagothérapie de l'ANSM, **il a été acté que la prescription, la dispensation ainsi que l'administration de suspensions de bactériophages doivent être effectuées au sein d'un établissement de santé** (17).

Ainsi, une demande de bactériophages ne peut être **initiée que par un médecin hospitalier** et les **suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une PUI** d'un établissement de santé. La suspension - lyophilisat de bactériophages, produite sur la base de la prescription initiale, sera reçue par la PUI qui devra alors assurer la mise en forme pharmaceutique afin de « faciliter » l'administration de la suspension. L'administration des bactériophages sera réalisée sous la responsabilité du médecin prescripteur en charge du patient et du pharmacien hospitalier.

Actuellement, aucun développeur n'a déposé de dossier de demande d'AMM en France et en Europe, pour une suspension de bactériophages. Il n'existe donc pas de « spécialités pharmaceutiques », de produits finis, à base de bactériophages sur le marché.

Au vu de ces éléments, les aspects réglementaires doivent être appréhendés **au regard du contexte clinique**. En effet, les demandes de bactériophages sont réalisées dans un contexte d'urgence puisqu'elles s'adressent à des patients en situation d'impasse thérapeutique en raison d'une multi-résistance aux antibiotiques à l'origine d'échecs aux traitements anti-infectieux disponibles sur le marché, avec un pronostic vital et/ou fonctionnel engagé. Le dispositif réglementaire sera également fonction :

- des **données** documentant la **qualité pharmaceutique intrinsèque du produit** garantie par un développement scientifique approfondi qui peut éventuellement s'appuyer sur des monographies ou autres textes de référence comme des guidelines, qui permettront d'identifier les éléments critiques qui contribuent à la qualité intrinsèque de la suspension-lyophilisat de bactériophages (identité, pureté, activité biologique et dose) ;

- **du référentiel de qualité** appliqué lors de la production et des étapes de contrôle avant libération (Bonnes pratiques de fabrication (BPF), Monographie...) ;
- **de la localisation géographique** de l'établissement assurant la production/contrôle et libération des suspensions-lyophilisats de bactériophages : France, pays de l'Union européenne, hors UE, etc.

Dans ce contexte, la **mise à disposition des suspensions-lyophilisats ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel. Dans ce dernier cas, il s'agira d'une mise à disposition :**

- dans le cadre d'**Autorisation Temporaire Utilisation (ATU) nominative** ;
- selon le **statut de matières premières pharmaceutiques, utilisées pour réaliser une préparation magistrale** (Annexe 1).

La mise à disposition de suspensions-lyophilisat de bactériophages peut être réalisée dans le cadre d'une **ATU nominative pour des préparations pour lesquelles la qualité intrinsèque est garantie par un développement pharmaceutique pertinent (le cas échéant encadré par des monographies et autres guidelines) et une stratégie de contrôle qualité qui permet d'assurer la qualité finale de la suspension-lyophilisat de bactériophage en termes d'identité, de pureté et d'activité, et dont la production industrielle est réalisée dans un établissement certifiée BPF.** En effet, la demande tendant à obtenir une ATU, déposée par le titulaire des droits d'exploitation ou son mandataire à l'ANSM, est accompagnée notamment :

- d'un dossier présentant les données relatives à la qualité pharmaceutique du médicament telle qu'elle est documentée dans le dossier d'AMM (module 3 du Common Technical Document) ;
- d'une copie de la demande d'AMM ou, lorsqu'elle n'a pas été déposée, une lettre du demandeur de l'autorisation temporaire d'utilisation s'engageant à déposer une telle demande dans un délai déterminé (26).

Ainsi l'ATU, s'applique exclusivement à un « candidat médicament spécialité pharmaceutique ». A ce jour, l'ANSM ne peut être amenée à octroyer des ATU en l'absence de suspensions-lyophilisats de bactériophages répondant à ces standards de qualité et de production industrielle.

Pour **les suspensions-lyophilisats de bactériophages qui ne disposent pas du statut de spécialité pharmaceutique-produit fini, et ne pouvant faire l'objet d'une ATU, une mise à disposition à titre compassionnel** selon le **statut de matières premières pharmaceutiques peut être envisagée.** L'hôpital militaire de la Reine Astrid à Bruxelles (HMRA) produit des suspensions ou lyophilisats de bactériophages, plus précisément des « *active pharmaceutical ingredient* » (API) qui peuvent être utilisés comme **des composants** ou « matières premières » d'une préparation magistrale ou hospitalière (27). Il s'agit de bactériophages caractérisés, lytiques, actifs sur une souche bactérienne.

Des étapes de préparation (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) ainsi qu'un contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale de bactériophages devront être réalisés par le pharmacien hospitalier de la PUI, sachant que les contrôles principaux sur la qualité de l'API seront réalisés par l'équipe de l'HMRA, conformément à la réglementation en vigueur qui impose à tout fournisseur d'apporter un bulletin de contrôle de la matière qu'il fournit. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique ce bulletin de contrôle pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation chez l'Homme de cette API. Les contrôles réalisés sur les API par l'HMRA sont détaillés dans la Monographie générale des bactériophages nationale belge (27–31). A noter que Pherecydes Pharma® produit des suspensions de bactériophages pouvant être mises à disposition selon le statut de matières premières. Il convient de rappeler que si la substance est considérée comme une matière première, il est attendu que le fabricant de matière première à usage pharmaceutique (MPUP) soit autorisé par l'ANSM (ou l'autorité de contrôle du pays dans lequel est implanté l'établissement de fabrication), à réaliser les activités de fabrication, d'importation et de distribution des substances actives.

La mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages doit, autant que possible, être privilégiée dans le cadre d'un essai clinique par rapport à une utilisation compassionnelle.

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus de mise à disposition des bactériophages. Une discussion collégiale doit être menée autour du cas afin d'analyser l'histoire clinique et thérapeutique du patient, le rapport bénéfice/risque d'une thérapie par bactériophages, et d'évaluer la qualité pharmaceutique de la substance au regard des informations fournies sur le produit.

III.4 La réglementation relative à la production et le contrôle de la qualité des suspensions-lyophilisats de bactériophages

Actuellement, il n'existe pas de recommandations spécifiques européennes portant sur la production ou les exigences en matière de qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages, c'est-à-dire des matières premières de bactériophages. Il ne peut donc pas être fait référence à des recommandations spécifiques « bactériophages ». Cependant, il est possible de faire référence à des textes existants et publications pour la production et le contrôle de la qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages tels que :

- en 2015, un groupe international composé de 29 « experts en bactériophages » de dix pays a défini des exigences en matière de qualité, de sécurité et d'efficacité pour les préparations de bactériophages (32) ;
- la directive européenne relative aux tissus et cellules (EUTCD) (33–35);
- les recommandations CHMP/ICH/294/95 Q5D (36) sur les substrats cellulaires et leur utilisation dans les productions de substances biologiques ;

- le texte de la Food and Drug Administration (FDA) : « *Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications* » (37) ;
- la Monographie générale des bactériophages nationale belge rédigée par l'équipe de l'HMRA et validée par l'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS) en janvier 2018 (27,30) ;
- de multiples publications (28,31,38–41).

Compte tenu de tous ces éléments initiaux sur la démarche qualité pour un produit biologique, les développeurs de suspensions-lyophilisats de bactériophages disposent donc d'un arsenal déjà conséquent pour établir les termes de référence de leur propre procédé et stratégie de contrôle des suspensions-lyophilisats de bactériophages qu'ils envisagent de produire. Aussi, pour les étapes de production et de contrôle, les critères d'acceptabilité seront donc adaptés et justifiés à leur propre produit.

III.5 Les données cliniques d'efficacité

Dans l'état actuel des connaissances, il existe **peu de données sur l'efficacité clinique des bactériophages** selon le mode d'administration et la posologie. Lors du colloque de l'EMA sur les bactériophages, le manque considérable de preuves scientifiques pour démontrer l'efficacité et la sécurité des bactériophages a été souligné (16). L'expérience clinique acquise sur les bactériophages depuis plusieurs années dans les pays de l'Est ne peut, à elle seule, constituer, sur un principe d'antériorité, un niveau d'efficacité et de sécurité suffisant. En effet, très peu de données ont été publiées sur cette large utilisation thérapeutique des bactériophages. Certaines publications rapportent que cette absence de communication s'explique en partie par la guerre froide, le gouvernement de l'ex-URSS n'autorisant les chercheurs à communiquer leur savoir-faire et leurs découvertes seulement dans des revues nationales c'est-à-dire en langue géorgienne ou russe (1,3,4). De plus, les rares travaux publiés ne respectent pas les standards actuels de la recherche clinique.

L'utilisation des bactériophages est donc empirique, elle est principalement basée sur un rationnel pharmacodynamique d'efficacité. A ce titre, et malgré l'antériorité, la notion d'usage médical bien établi, tel que prévu par la réglementation européenne, ne peut pas servir de base actuellement à l'octroi d'une AMM.

L'ANSM, tout comme l'EMA, encourage fortement la réalisation d'essais cliniques évaluant les bactériophages (16,17). Seuls des essais cliniques avec une randomisation et des critères de jugement pertinents permettraient d'apporter la preuve scientifique de l'efficacité clinique et de la sécurité des bactériophages dans les différents contextes cliniques (indications) qui auraient été étudiés par ces essais cliniques. En effet, par définition l'essai clinique permet de définir un protocole expérimental (idéalement randomisé) dans le but de minimiser au maximum les biais et de pouvoir porter à la fin de l'expérimentation un jugement de causalité.

De nombreuses études expérimentales ont été réalisées chez l'animal. Un certain nombre d'articles ont été publiés au cours de ces 20 dernières années démontrant, pour la grande majorité d'entre eux, l'efficacité des bactériophages dans différents types d'infections notamment pour le traitement d'infections bactériennes notamment respiratoires, cutanées, digestives induites par *P. aeruginosa*, *E. coli* ou *S. aureus* (5).

Les modèles animaux peuvent permettre de vérifier que les bactériophages sont actifs *in vivo* sur un panel de souches bactériennes et de proposer un schéma posologique en clinique. Ainsi, l'évaluation de la phagothérapie peut s'appuyer sur des éléments prédictifs (efficacité, résistance) que peuvent fournir les modèles animaux expérimentaux. Cependant, la méthodologie de ces études ainsi que le choix des bactériophages, du modèle animal, du couple « bactéries-bactériophages » est fondamental afin que les résultats de ces études expérimentales soient exploitables pour être ensuite transposés dans un essai clinique qui restera toujours nécessaire pour évaluer la sécurité et l'efficacité chez l'Homme et dans la situation clinique revendiquée.

A ce jour, les essais cliniques utilisant des bactériophages et conduits selon les standards en matière de recherche biomédicale (double aveugle, randomisé, contrôlé) sont au nombre de cinq : 1 mené chez des sujets sains, 4 menés chez des sujets malades (8–12). Ces essais sont résumés dans l'Annexe 2.

Deux programmes hospitaliers de recherche clinique sont sur le point d'être engagés :

- le projet PHAGOS : essai clinique de phase I/II, multicentrique, randomisé, en ouvert, contrôlé *versus* traitement standard, dont l'objectif est d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la phagothérapie associée au traitement standard (chirurgie et antibiotiques) dans les infections chroniques de prothèses de hanche ou de genou à *Staphylococcus* (42) ;
- le projet PHAGOPIED : essai clinique de phase I/II, randomisé, multicentrique, contrôlé *versus* placebo, en double aveugle, de supériorité visant à comparer l'efficacité d'un traitement standard associé à des bactériophages *versus* un traitement standard associé à un placebo dans le traitement des ulcères du pied infectés à *S. aureus* chez les patients diabétiques (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02664740) (43).

Il convient de préciser que dans un contexte de sollicitations croissantes, **l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a encadré la mise à disposition de bactériophages** pour une quinzaine de patients depuis 2016. En majorité, il s'agissait d'infections ostéo-articulaires pour lesquelles des administrations locales *in situ* de phages ont été réalisées (13).

III.6 Sécurité de l'utilisation thérapeutique des bactériophages

III.6.a Les bactériophages tempérés

Le principal risque lié à la phagothérapie est de trouver en présence de bactériophages tempérés dans une préparation thérapeutique. En effet, les bactériophages tempérés présentent la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien sans tuer son hôte. Ils sont donc de potentiels vecteurs de gènes de virulence ou d'antibiorésistance et peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non.

En thérapeutique, il est ainsi impératif d'utiliser des bactériophages lytiques caractérisés et de vérifier par ailleurs l'absence de bactériophages tempérés dans **la suspension-lyophilisat produit, autrement dit la matière première-principe actif de bactériophages** (28,44). Des investigations doivent être menées par le biais notamment d'analyses du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la suspension afin de limiter le risque lié à la présence de bactériophages tempérés, potentiellement et indirectement pathogènes pour l'homme.

III.6.b Les risques pour le patient

Les bactériophages ne possèdent pas la capacité d'infecter les cellules eucaryotes et ne présentent donc pas d'effets reprotoxiques et mutagènes. L'analyse des données de la littérature n'a pas mis en évidence une toxicité physico-chimique des bactériophages à l'origine de lésions tissulaires.

Les bactériophages étant des virus, leur administration peut provoquer une réaction immunitaire. Cette réaction, potentiellement néfaste, peut mettre en jeu soit les mécanismes de **l'immunité innée** avec la sécrétion de cytokines et le recrutement de cellules pro-inflammatoires, soit ceux de **l'immunité adaptative** avec la synthèse d'anticorps. L'immunogénicité directe des bactériophages impliquant les mécanismes de l'immunité innée semble négligeable dès lors que les suspensions sont correctement purifiées, comme en témoigne les expérimentations chez l'animal ainsi que les 2 études réalisées par Nestlé® avec le cocktail de bactériophages T4 et le cocktail Microgen® citées précédemment dans l'Annexe 2 (8,9,45).

Par ailleurs, **la lyse bactérienne** suite à l'action des bactériophages est à l'origine de la libération d'ADN bactérien, d'endotoxines et de composants bactériens membranaires tels que l'acide lipoteichoïque et le peptidoglycane. Ces protéines sont de puissants antigènes pouvant être immunogènes chez l'homme. Il convient de rappeler que la libération d'endotoxines est une étape clé dans la physiopathologie du sepsis et du choc septique. La lyse bactérienne pourrait donc être à l'origine de réactions immunitaires indirectes, par la libération de composants antigéniques. Une étude récente menée par Dufour et *al* a comparé, *in vitro*, la libération d'endotoxines et la capacité à tuer les bactéries : de bactériophages thérapeutiques versus 4 traitements antibiotiques (7). Les résultats ont montré que les bactériophages sont à l'origine d'une lyse bactérienne plus rapide que celle provoquée par l'action des β -lactamines et que la concentration en endotoxines cumulée générée suite à l'action de ces bactériophages sur des souches bactériennes est

inférieure à celle générée suite à l'action des β -lactamines (7). Les mêmes auteurs ont également montré, cette fois *in vivo* chez l'animal (modèle de pneumonie aiguë), que l'administration de deux bactériophages ne s'accompagnaient pas d'une augmentation de la synthèse de cytokines de l'inflammation aiguë. Au contraire, de façon identique (voir supérieure) à ce qui était observée chez les animaux traités par des antibiotiques de référence, le traitement par phages diminuait l'inflammation chez les animaux infectés (6).

Le second mécanisme immunogène serait l'induction d'une réponse humorale avec la production d'anticorps neutralisants. Le développement de ces anticorps anti-phages pourrait être à l'origine d'une inefficacité d'un futur traitement basé sur les bactériophages sources de l'immunisation. Cependant, M. Źaczek et al. ont montré que la production d'anticorps ne semblait pas influencer le pronostic infectieux et l'efficacité du traitement (46). Dans une autre étude sur 15 volontaires sains ayant reçu un cocktail de bactériophages T4, aucun n'a développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage testé (8).

Les essais cliniques cités précédemment ne mettent pas en évidence d'effet indésirable particulier. Les profils de tolérance de chacune des suspensions de bactériophages administrées par diverses voies sont acceptables (cf. Annexe 2). Les données de tolérance dont nous disposons sont principalement issues d'études chez l'animal et des 5 essais cliniques conduits selon une méthodologie suffisante. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires.

Malgré l'expérience clinique abondante dont disposent les pays de l'est, le nombre limité de publications sur cette large utilisation thérapeutique des bactériophages ne permet pas d'exclure d'éventuels signaux de vigilance relatifs à la tolérance et à la sécurité de l'administration des bactériophages.

En résumé, les potentiels risques et effets indésirables liés à l'administration de bactériophages sont :

- une inefficacité des bactériophages choisis et sélectionnés sur la base de la sensibilité de la souche bactérienne visée, pour le traitement des infections bactériennes en lien avec le développement d'une résistance bactérienne aux bactériophages (47) ;
- une production d'anticorps anti-phages spécifiques en lien avec une réponse immune adaptative de type humorale ;
- une réaction inflammatoire aiguë en lien avec une réponse immune innée ;
- une réaction immunitaire liée à la libération de composés antigéniques lors de la lyse bactérienne.

III.6.c Les risques associés à la manipulation des bactériophages

Il est important de se questionner sur les règles de prévention et les exigences requises pour la manipulation des bactériophages. Il existe un classement des micro-organismes naturels qui concerne les bactéries, les virus, les parasites et les champignons (48). Les critères de ce classement sont présentés dans le **Tableau I**.

Il existe 4 groupes selon la pathogénicité du micro-organisme, l'existence ou non d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace. La connaissance des agents biologiques et de leur classement conditionne les règles de prévention, notamment les niveaux de confinement 1, 2, 3 ou 4, requis pour leur manipulation.

Tableau I. Groupe de risque : du plus faible (1) au plus important (4) (48)

Critère	GROUPE 1	GROUPE 2	GROUPE 3	GROUPE 4
Pathogène chez l'homme	Non	Oui probable	Oui Maladie grave	Oui Maladie très grave
Dangereux pour l'opérateur	Sans objet	Oui Modérément	Oui Risque élevé	Oui Risque très élevé
Propagation	Sans objet	Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement	Sans objet	Oui	Oui généralement	Non
Exemples	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> non pathogène	Virus de la rougeole <i>Clostridium tetani</i>	VIH, VHB <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Virus Ebola Virus de la variole

Les bactériophages thérapeutiques appartiennent au groupe 1 de la classification des agents biologiques (28,44). Ils ne sont pas pathogènes pour l'homme de façon directe. Néanmoins, ils peuvent transférer des facteurs de virulences, des toxines à un autre hôte : la bactérie. Par ce transfert, ils augmentent la virulence des bactéries. Ainsi les bactériophages pourraient être des vecteurs de maladie, mais un hôte intermédiaire est nécessaire. Le principal risque des bactériophages doit donc être considéré par rapport à l'environnement.

Le niveau de sécurité biologique sera également fonction de la souche bactérienne utilisée lors des différentes étapes de production de bactériophages (isolement, sélection, amplification, purification). Une production de bactériophages avec une bactérie de type *E. coli* O157:H7² devra être réalisée au sein d'un laboratoire confiné de niveau de sécurité biologique 2, tandis qu'une production avec une souche *E. coli* non pathogène devra être réalisée au sein d'un laboratoire confiné de niveau de sécurité biologique 1.

² *E. coli* O157:H7 est un des sérotypes d' *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC. Les EHEC colonisent le tube digestif puis libèrent des toxines (Shigatoxines) pouvant induire des lésions vasculaires aux niveaux intestinal, rénal et cérébral. Les EHEC peuvent donc être responsables de troubles variés, allant d'une diarrhée bénigne à des formes plus graves comme des diarrhées hémorragiques et/ou des atteintes rénales sévères appelées syndrome hémolytique et urémique (SHU) principalement chez le jeune enfant ou micro-angiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte.

III.7 Les différentes sources de bactériophages thérapeutiques en France et en Europe

A ce jour, les bactériophages disponibles ne permettent pas de couvrir l'intégralité des souches bactériennes pathogènes susceptibles d'être rencontrées en pratique clinique en situation de multirésistance. Il demeure que la diversité et le nombre de bactériophages disponibles au sein des banques (phagothèques) sont limités. Or, il convient de rappeler que la production de bactériophages est un processus long et complexe qui se décompose en plusieurs étapes : l'isolement du phage d'intérêt (sauf si la souche pertinente existe déjà dans une phagothèque), sa caractérisation, sa qualification et sa production en quantité suffisante.

Les différentes sources de bactériophages disponibles en France et en Europe sont présentées ci-dessous (liste non exhaustive).

III.7.a Bactériophages de la société Pherecydes Pharma® (France)

Start-up française, Pherecydes Pharma® a été créée pour développer des solutions thérapeutiques à base de bactériophages pour le traitement des infections bactériennes. Pherecydes Pharma® a ainsi mis au point des technologies pour sélectionner et produire des bactériophages actifs contre les bactéries résistantes et multi-résistantes et dispose d'une collection limitée de bactériophages. Les procédés d'isolement, de caractérisation, de purification et de production des suspensions de bactériophages sont connus des instances. Pherecydes Pharma® réalise un certain nombre de contrôles, essentiellement microbiologiques sur les suspensions de bactériophages, conformément aux méthodes microbiologiques décrites à la Pharmacopée européenne (9^{ème} édition) et fournit un certificat d'analyse du lot.

Dans la mesure où il n'existe pas à ce jour de Monographie spécifiques aux bactériophages dans la Pharmacopée européenne ou française, ces contrôles ne sont donc pas spécifiques aux attributs qualité des bactériophages, mais essentiellement destinés à vérifier les exigences générales relatives à la voie d'administration choisie.

Pherecydes Pharma® produit des suspensions de bactériophages caractérisés, mises à disposition selon le statut de matières premières. Des étapes de préparation (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) ainsi qu'un contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale de bactériophages doivent donc être réalisés par le pharmacien hospitalier de la PUI afin de permettre une administration chez l'homme.

Pherecydes Pharma® réalise le phagogramme, au sein de ses locaux.

III.7.b Bactériophages de l'Hôpital Militaire de la Reine Astrid (Belgique)

Les chercheurs de l'HMRA à Bruxelles étudient les bactériophages depuis 2006. Ils ont participé à l'essai clinique multicentrique international Phagoburn® qui évaluait l'efficacité et la tolérance des bactériophages dans le traitement des plaies infectées à *E. coli* ou à *Pseudomonas aeruginosa* chez les grands brûlés.

Cette structure dispose d'une banque de bactériophages dont les origines sont diverses : Europe de l'Est, Allemagne, etc. Les bactériophages sont séquencés, caractérisés puis stockés dans leurs locaux.

Les chercheurs isolent, purifient et caractérisent des bactériophages conformément à une Monographie générale des bactériophages nationale belge validée par l'AFMPS en janvier 2018 (27–31). La Monographie présente des recommandations et points techniques à prendre en compte lors de l'isolement, la caractérisation et la purification d'un type de bactériophage. Toutes ces étapes sont réalisées au sein d'un établissement de santé, dans un environnement contrôlé (contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air) afin de limiter la contamination microbienne - particulière et la dégradation des bactériophages. L'HMRA garantit le caractère lytique des bactériophages caractérisés et réalise un certain nombre de contrôles (27–31).

A ce jour, L'HMRA produit des principes actifs de bactériophages à usage pharmaceutique (API), sous la forme de suspension ou lyophilisats, pouvant être utilisés comme des composants ou « matières premières » d'une préparation magistrale ou hospitalière.

III.7.c Bactériophages des laboratoires de recherche académique (France)

L'Institut Pasteur de Paris dispose de bactériophages actifs essentiellement sur des souches *E. coli* ou *P. aeruginosa*. Ils sont en mesure de réaliser un phagogramme au sein de leurs locaux avec les bactériophages de leur banque. La purification est réalisée selon un mode opératoire spécifique. Ils garantissent le caractère lytique des bactériophages caractérisés. Les bactériophages dont ils disposent ne peuvent être utilisés directement en clinique, des étapes de production en quantité et de contrôle des suspensions obtenues doivent être réalisées.

III.7.d Bactériophages de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Allemagne)

La DSMZ (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires) est un centre qui appartient à l'Institut Leibniz, localisée en Allemagne. Ce centre dispose d'importantes collections de levures, bactéries, champignons et bactériophages. L'équipe de recherche réalise les étapes de caractérisation des bactériophages de leur collection. Ils garantissent le caractère lytique des bactériophages caractérisés. Ils ne prennent cependant pas en charge les étapes de production en grande quantité, purification et de contrôle de qualité pharmaceutique des suspensions de bactériophages. Ainsi, les bactériophages dont ils disposent ne peuvent être utilisés directement en clinique et il faudrait disposer d'un sous-traitant habilité à réaliser les étapes de production et de contrôle avant que ces suspensions ne puissent être utilisées en clinique.

III.7.e Bactériophages de l'Institut Eliava (Géorgie)

Cet institut situé à Tbilissi en Géorgie est entièrement dédié aux bactériophages et à ses applications thérapeutiques. En dépit de l'arrivée des antibiotiques, les Géorgiens n'ont jamais cessé de pratiquer la phagothérapie. Cependant, peu de données sur cette utilisation ont été publiées. Cet institut dispose d'une

importante collection de bactériophages qu'ils utilisent pour traiter des infections dues à des bactéries multi-résistantes. Malheureusement, nous ne disposons d'aucune donnée sur la caractérisation des bactériophages de leur phagothèque, pas plus que sur les étapes de production et le contrôle des suspensions préparées pour usage clinique.

III.7.f Bactériophage de l'Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale Ludwik Hirszfeld (Pologne)

Cet institut, autrefois Institut de microbiologie médicale, est un centre de recherche situé à Wrocław, en Pologne, fondé en 1952. Le principal fondateur est le microbiologiste et immunologiste Ludwik Hirszfeld. C'est l'un des rares centres de recherche en Europe de l'Est, avec l'Institut George Eliava, à avoir développé le domaine de la phagothérapie. Cette équipe de recherche a mis au point des méthodes pour isoler les bactériophages et pour produire des suspensions de bactériophages utilisables en clinique. L'institut dispose de sa propre unité de production ouverte en 2005. Cependant, l'utilisation thérapeutique des bactériophages au sein de cet institut est réalisée dans le cadre légal de la déclaration d'Helsinki. En effet, dans la mesure où elle n'est pas encore une thérapie approuvée, elle reste une thérapie expérimentale. Peu de données sur l'utilisation thérapeutique des bactériophages isolés et amplifiés par cet institut ont été publiées. Malheureusement, nous ne disposons également d'aucune donnée sur la caractérisation des bactériophages, les étapes de production et le contrôle de la qualité pharmaceutique des suspensions qui sont utilisées dans cet institut.

III.7.g Bactériophages de la société AmpliPhi Biosciences Corporation® (États-Unis)

Il s'agit d'une société de biotechnologie dont les principaux axes de recherche et de développement sont la mise au point de solution thérapeutique à base de bactériophages et de peptides pour le traitement des infections bactériennes multirésistantes. Le site de production se situe en Slovaquie. Un certain nombre de cocktails de bactériophages produits par AmpliPhi® ont été autorisés pour un usage compassionnel en Australie et aux États-Unis (49–53). Toutefois comme pour les autres centres présentés plus haut, nous ne disposons d'aucune donnée sur la qualification des bactériophages contenus dans la phagothèque, ni sur le procédé de production des suspensions à usage clinique, ni sur les procédures et critères de contrôle qualité.

IV Les modalités de l'accès à la phagothérapie en France

IV.1 Les situations cliniques potentiellement éligibles à un traitement par bactériophages

La décision de débiter un traitement par bactériophages doit être prise par une équipe hospitalière pluridisciplinaire : médecin hospitalier, pharmacien hospitalier ainsi qu'avec un infectiologue référent dans le domaine et si besoin un chirurgien. Chacun des paramètres tels que la voie d'abord, la posologie, les dispositifs médicaux (DM) utilisés doivent être discutés en amont en réunion de concertation pluridisciplinaire, afin d'optimiser l'efficacité du traitement et de sécuriser l'administration.

Compte tenu des interrogations croissantes sur les bactériophages émanant de la communauté scientifique, médicale et des patients, l'ANSM a souhaité élaborer lors du CSST du 24/03/2016 une position quant aux situations cliniques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages (17).

Un consensus de critères justifiant une situation de besoin applicable à tout type d'infection pour un accès précoce aux bactériophages a été défini :

- un pronostic vital engagé ou un pronostic fonctionnel menacé ;
- une situation d'impasse thérapeutique (c'est-à-dire en « situation de sauvetage ») ;
- une infection monomicrobienne.

Par ailleurs, au regard des données à ce jour limitées permettant de sous-tendre l'utilisation des bactériophages, il a été acquis :

- la nécessité d'une collégialité sur la démarche thérapeutique avec l'équipe clinique, l'ANSM pouvant être assistée d'experts ponctuels ;
- la nécessité de disposer des résultats d'un phagogramme, ayant identifié un bactériophage compatible avec l'infection à traiter, avant la décision d'une mise sous traitement (imposant la réalisation d'un phagogramme dans des délais rapides). Le cas où le phagogramme, qui testera les différents bactériophages « disponibles » pour envisager une production d'une suspension de bactériophages pertinents, révélerait qu'aucun bactériophage des phagothèques analysées n'est pertinent, imposera alors le recours à une première étape d'identification et sélection d'une nouvelle souche de bactériophages.

Les critères définis par le CSST décrivent la situation clinique idéale. Cependant, l'expérience clinique sur les bactériophages, acquise au cours de ces 2 dernières années, la disponibilité limitée des cocktails de bactériophages et les incertitudes sur cette thérapeutique sont 3 facteurs qui ont participé à l'évolution de

certaines de ces critères. Ainsi, des cas pratiques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages ont été définis :

- **Une résistance bactérienne aux antibiotiques** : une infection plurimicrobienne avec par exemple une souche toto-résistante et une souche sensible à un traitement par antibiotiques.
La notion d'infection mono-microbienne est donc à pondérer. Dans certains cas, l'infection peut être polymicrobienne, mais une seule bactérie va être ciblée par la suspension de bactériophages car elle est la cause de la morbidité infectieuse. Les autres bactéries présentes au niveau du foyer infectieux seront couvertes par une antibiothérapie adaptée. A titre d'illustration, dans les infections ostéo-articulaires, les infections polymicrobiennes correspondent à environ 10% des infections sur prothèses ;
- Une infection dont le germe reste sensible à certains antibiotiques mais dont la **morbidité liée au traitement** (aggravation de la fonction rénale, allergie, etc.) devient inacceptable ;
- **Une inefficacité clinique** : infection difficile à éradiquer avec un passage à la chronicité. C'est le cas par exemple des infections osseuses, où les germes peuvent être sensibles aux antibiotiques. Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'antibiotique jouent un rôle primordial dans l'éradication des bactéries. Cependant, dans certaines situations, il est difficile d'atteindre les concentrations efficaces en raison par exemple d'une faible diffusion de l'antibiotique au niveau du site d'intérêt. De plus, les bactéries peuvent produire un biofilm (sur le matériel orthopédique notamment) afin de se protéger de l'environnement. Elles deviennent alors inaccessibles aux antibiotiques et échappent au système immunitaire de l'hôte. De façon intéressante, certains bactériophages ont la capacité d'hydrolyser les polysaccharides bactériens qui composent les biofilms (54–56).

IV.2 Information de l'ANSM quant au projet d'utilisation thérapeutique des bactériophages

Le médecin hospitalier en charge du patient ainsi que le pharmacien hospitalier **doivent informer l'ANSM de leur intention d'administrer une suspension de bactériophages à un patient.** L'équipe médicale doit présenter le cas en détaillant :

- **l'histoire détaillée de la maladie**
- **l'historique détaillé et exhaustif des traitements antibiotiques,**
- **l'identification du/des germe(s) avec l'antibiogramme,**
- **la voie d'administration et la posologie envisagée de la suspension bactériophages,**
- **les conditions de manipulation des suspensions de bactériophages** : la manipulation des suspensions-lyophilisats de bactériophages (dilution, préparation de seringues...) doit être réalisée au sein d'un environnement contrôlé : contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air.

En effet, il est nécessaire d'évaluer la pertinence de la demande de bactériophages au regard des données cliniques et des données de la littérature avant de réaliser le phagogramme. L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans ce processus d'évaluation avec une possible sollicitation d'experts ponctuels externes.

Contacts : Direction Produits en charge des vaccins, des médicaments anti-infectieux, en hépatogastroentérologie, en dermatologie, de thérapie génique et des maladies métaboliques rares (INFHEP), pôle MALINF.

Organigramme pôle INFHEP : [https://www.ansm.sante.fr/Les-contacts-utiles-a-l-ANSM - VACCIN](https://www.ansm.sante.fr/Les-contacts-utiles-a-l-ANSM-VACCIN)

Responsable : Nathalie.MORGENSZTEJN@ansm.sante.fr

IV.3 Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux bactériophages et de l'efficacité à former des plages de lyse

IV.3.a Le phagogramme

De la même manière que sont réalisés les antibiogrammes pour sélectionner les antibiotiques actifs sur la bactérie responsable de l'infection, il est possible et nécessaire de réaliser un **phagogramme**. Les bactériophages étant spécifiques d'une espèce bactérienne, voire seulement de quelques souches de cette espèce, le principal risque lié à une administration d'un bactériophage sans avoir vérifié son activité via un phagogramme est l'absence d'efficacité.

Le phagogramme a pour objectif de tester **la sensibilité de la souche bactérienne** vis-à-vis d'un ou de plusieurs bactériophages candidats qui sont détenus dans une phagothèque. Il démontre *in vitro* que certains bactériophages présentent un effet bactéricide sur la souche bactérienne. L'analyse des résultats de ce test permet d'identifier et de sélectionner des bactériophages spécifiquement actifs contre la bactérie incriminée afin de mettre au point, si jugé utile, un cocktail thérapeutique « sur mesure » de plusieurs bactériophages différents. L'utilisation simultanée de plusieurs bactériophages sur une unique souche bactérienne peut être à l'origine d'un phénomène de potentialisation (synergie d'action) et d'une réduction du risque d'apparition de résistance (2).

La réalisation du phagogramme est relativement similaire à celle d'un antibiogramme (technique des « sur-spots ») : une culture bactérienne de la souche d'intérêt (isolat clinique du patient) est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu nutritif solide. Une fois la surface sèche, quelques microlitres de différentes suspensions de bactériophages (1 à 2 µL) sont déposés. Les résultats sont lus après une incubation (4 à 12 heures à 37 °C). L'activité d'un bactériophage sur les bactéries sensibles conduit à une lyse de ces dernières, caractérisée par l'apparition des « plages » de lyse (plage claire sur le milieu de culture) à l'endroit où la

goutte de bactériophage a été déposée (**Figure 3.**). La présence d'une plage de lyse témoigne donc de la sensibilité de la souche bactérienne au bactériophage testé (57,58).

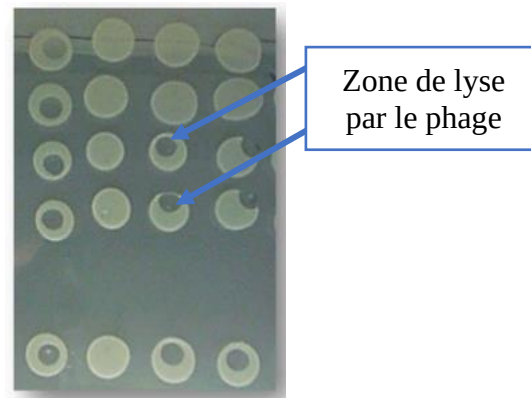


Figure 3. Aspect de la technique des « sur-spots », un même bactériophage est testé sur 20 souches bactériennes différentes (2)

Le phagogramme permet d'identifier grossièrement les bactériophages actifs sur une souche bactérienne donnée. Il donne une première idée de l'efficacité des bactériophages disponibles sur la souche bactérienne. Cependant, constater sur le phagogramme une lyse bactérienne n'est pas suffisant pour attester et encore moins quantifier l'efficacité du/des bactériophage(s). Il ne peut être utilisé seul pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes aux bactériophages (58).

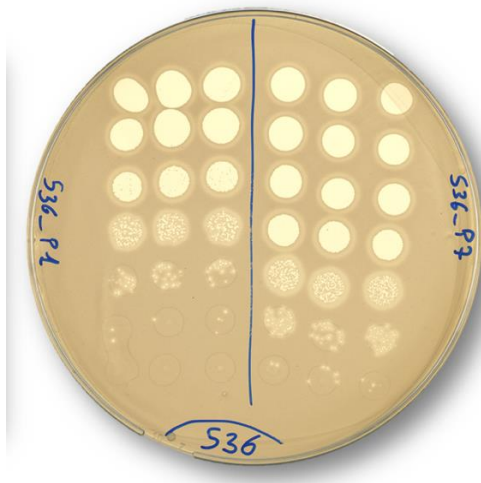
Il est donc nécessaire de réaliser ensuite **une titration et une étude de la cinétique de lyse.**

IV.3.b Titration et cinétique de lyse

L'étape de titration permet :

- de mettre en évidence des plages de lyse individualisées, seuls témoins de la présence d'un cycle infectieux viral chez les bactéries ;
- de définir la concentration de bactériophages actifs à l'origine d'une lyse bactérienne, soit le nombre de bactériophages actifs contenus dans la suspension, en Plaque-Forming Units (PFU)/mL.

Lors de la titration, différentes dilutions (facteur 10) d'une suspension contenant un clone de bactériophages à titrer sont réalisées et testées sur la souche bactérienne hôte d'intérêt (**Figure 4.**). Cette technique permet la visualisation de plages de lyse individualisées à différentes concentrations de bactériophages. Le titre est déduit du nombre de plages de lyse (PFU/mL), chaque bactériophage donnant potentiellement une plage de lyse.



Chaque solution de bactériophage a été diluée de façon sériée d'un facteur 10, de haut en bas (10^{-1} à 10^{-7}) et 4 μ L de chaque dilution ont été déposés en triplicat sur une gélose préalablement recouverte de la souche 536 à tester.

En comptant les plages de lyse individuellement observées aux dilutions les plus importantes, il est ainsi possible de déterminer le nombre de particules virales infectantes par mL de solution (PFU/mL).

Figure 4. Exemple de titration de 2 solutions de bactériophage 536-P1 et 536-P7, sur la souche *E. coli* 536. Des dilutions en série de 2 bactériophages (536-P1 et 536-P7) ont été déposées sur la souche 536 (2).

Différentes méthodes existent pour déterminer le titre de la suspension de bactériophages :

- Double agar overlay method (59) ;
- Direct plating plaque assay (60) ;
- Small drop plaque assay system (61).

La titration permet de calculer **l'efficiency of plaquing (EOP)** (57,58). Il s'agit de l'efficacité des bactériophages à former des plages de lyse en milieu gélosé, autrement dit l'efficacité des bactériophages à lyser les bactéries. L'EOP est basée sur la comparaison de l'activité d'une suspension de bactériophages sur la souche du patient *versus* celle qui a permis d'isoler le bactériophage (souche-hôte). Elle est obtenue en titrant une suspension d'un bactériophage X :

- sur une bactérie A d'intérêt, par exemple la souche responsable de l'infection ;
- sur la bactérie B de référence : l'hôte primaire du bactériophage c'est-à-dire celui ayant permis d'isoler le bactériophage (57,58).

Des dilutions successives de la suspension de bactériophages sont étalées d'une part sur une boîte contenant une culture bactérienne de la souche du patient et d'autre part sur une boîte contenant l'hôte primaire. Après incubation de plusieurs heures à 37 °C, il est alors possible de visualiser pour une dilution donnée le nombre de particules virales et d'en déduire la concentration de particules virales actives dans la suspension (57,58). La concentration de bactériophage obtenue sur la souche du patient, c'est-à-dire le titre, peut être inférieure à celle obtenue sur la souche-hôte. C'est le reflet d'une efficacité moindre du bactériophage à détruire la souche du patient par rapport à la souche-hôte.

L'EOP est ainsi le rapport de ces deux concentrations :

EOP = titre sur A / titre sur B.

M. Khan Mirzaei et A. S. Nilsson ont défini des intervalles selon les valeurs de l'EOP :

- valeur **supérieure ou égale à 0.5** : efficacité **importante** à former des plages de lyse ;
- valeur **comprise entre 0.1 et 0.5** : efficacité **moyenne** à former des plages de lyse ;
- valeur **comprise entre 0.001 and 0.1**, efficacité **faible** à former des plages de lyse : le bactériophage risque d'être peu efficace ;
- valeur **inférieure ou égale à 0.001** : efficacité **insuffisante** : le bactériophage risque d'être inefficace (58).

L'étude de la cinétique de lyse permet d'évaluer l'activité du/des bactériophage(s) en milieu liquide (Figure 5) (2). Une culture bactérienne est mélangée avec une suspension de bactériophages. Une lecture de la densité optique est réalisée à différents temps. Par suivi de la turbidité du milieu, il est possible de confirmer l'absence de croissance bactérienne.

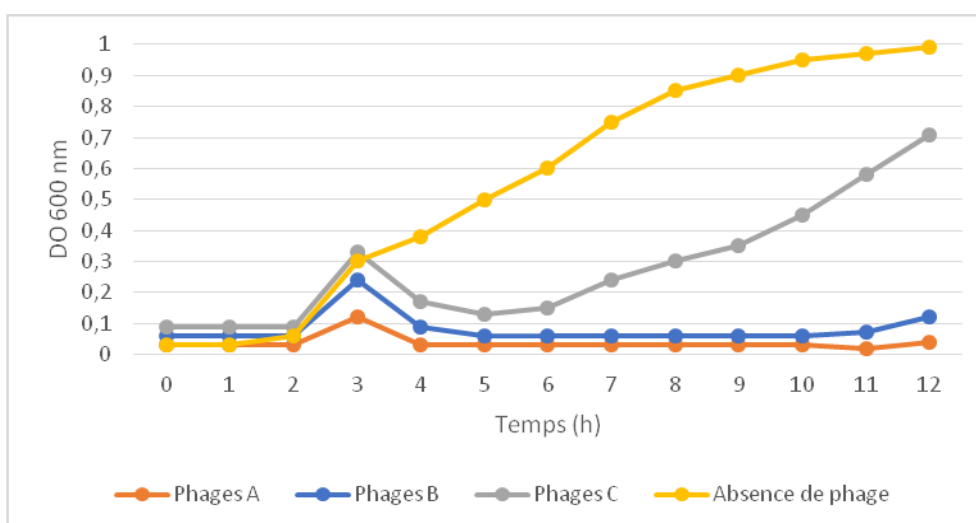


Figure 5. Cinétique de lyse d'une souche X par les bactériophages A, B et C.

Les bactériophages A et B sont efficaces sur la souche bactérienne d'intérêt, ils sont à l'origine d'une lyse bactérienne, comme en témoigne l'absence d'augmentation de la turbidité du milieu après une phase initiale de croissance bactérienne à H3. Le bactériophage C n'est que transitoirement actif et ne réussit pas à enrayer la croissance bactérienne de façon prolongée.

La réalisation du phagogramme, ainsi que la détermination des paramètres tels que le titre de la préparation et l'EOP, constituent des étapes préalables à l'administration des bactériophages. Lors de la réunion du CSST dédié à la phagothérapie créé le 24/03/2016 par l'ANSM, il a été admis, au regard des données limitées à ce jour, la nécessité de disposer des résultats du phagogramme avant la décision

d'une mise sous traitement (17). L'efficacité présumée d'une phagothérapie préalablement à son administration doit ainsi prendre impérativement en compte l'activité du ou des bactériophages sur les souches bactériennes isolées chez le sujet.

Ces tests peuvent être réalisés par les sociétés commercialisant les bactériophages. Pour ce faire, il est nécessaire d'envoyer la souche du patient en respectant les conditions de transport (cf. V.1). Dans le cas où le laboratoire commercialisant les préparations de bactériophages n'effectue pas le phagogramme, il est possible de le réaliser au sein du laboratoire de microbiologie. Cependant, une telle réalisation nécessite un espace dédié et une formation rigoureuse du personnel. En effet, la réalisation du phagogramme (étapes de dilution, pipetage, normalisation de la densité bactérienne au départ, etc.) ainsi que la lecture des résultats (analyse des plages de lyse) doivent être réalisées par une personne expérimentée afin d'augmenter la sensibilité du test et de limiter les biais d'interprétation et le risque d'erreurs.

IV.4 Évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières de bactériophages et les étapes de préparation – contrôle de la qualité pharmaceutique des préparations terminées

IV.4.a Évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières de bactériophages

Il convient de rappeler que les contrôles principaux sur la qualité pharmaceutique des matières premières - substances actives de bactériophages devront être réalisés par le fabricant-industriel-développeur, conformément à la réglementation en vigueur qui impose à tout fournisseur d'apporter un bulletin de contrôle de la matière première qu'il fournit. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique ce bulletin de contrôle pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation chez l'Homme de cette matière première-substance active.

Selon des textes spécifiques relatifs aux principes actifs de bactériophages, soient les suspensions-lyophilisats, tels que la Monographie générale belge sur les bactériophages, et des textes généraux tels que la Monographie générale de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition : « Substances pour usage pharmaceutique » (2034) et les autres textes existants, une liste des exigences relatives à la production et aux contrôles qualité des matières premières de bactériophages a été définie (27,28,31,32,38–40).

Pour les contrôles réalisés sur la matière première-substance active, les éléments suivants devront être détaillés : les référentiels utilisés (exemple Pharmacopée européenne, monographie nationale), les méthodes analytiques, les critères d'acceptation. Ces contrôles devront être réalisés au sein d'un environnement parfaitement maîtrisé en termes de contamination microbienne, particulaire et pyrogène (zone à atmosphère contrôlée, ZAC...), conformément à la réglementation en vigueur (Pharmacopée européenne, BPF...).

Les informations et contrôles listés ci-dessous sont indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières - substances actives et devraient être détaillées sur le bulletin de contrôle :

- **les référentiels utilisés pour la caractérisation de la bactérie utilisée pour l'isolement du bactériophage** : la directive européenne relative aux tissus et cellules (EUTCD) (33–35), les guidelines CHMP/ICH/294/95 Q5D (36), le texte de la Food and Drug Administration (FDA) : « *Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications* » (37) ;
- **le référentiel de fabrication utilisé** : BPF par exemple ;
- **le détail du procédé de fabrication de la substance active-matière première** : procédé de fabrication précis avec la liste des matières premières utilisées et leurs spécifications, y compris les banques de bactériophages et de bactéries servant à la production ;
- **la caractérisation de la bactérie servant à la production** : identité, viabilité, absence de production de toxines pathogènes, génotype, pureté ;
- **la caractérisation des bactériophages** : identité (famille, sous famille, genre, espèce), caractère lytique, structure par microscopie électronique, séquençage génomique, vérification de l'absence de gènes impliqués dans le processus d'intégration virale au génome bactérien, liste des bactéries sensibles aux bactériophages.

Comme précisé aux chapitres précédents, il est ainsi impératif d'utiliser en thérapeutique des bactériophages lytiques caractérisés, et de vérifier par ailleurs l'absence de bactériophages tempérés dans la suspension-lyophilisat produit par le fabricant (28,44). Des investigations doivent être menées par le biais notamment d'analyses du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la suspension-lyophilisat (matière première) afin de limiter le risque lié à la présence de bactériophages tempérés, potentiellement et indirectement pathogènes pour l'homme.

Il faut noter que l'administration de bactériophages dont la caractérisation est incomplète (devant la persistance d'inconnues concernant certains gènes d'antibiorésistance ou codant pour des toxines bactériennes) peut être à l'origine de transfert de facteurs de virulence aux souches bactériennes responsables de l'infection.

Une comparaison du génome du bactériophage isolé avec celui d'un homologue proche identifié ainsi que la recherche de gènes codant pour des intégrases, transposases ou recombinases, des gènes de virulences doivent être réalisées (29,39).

Ces résultats permettront de renseigner et confirmer :

- l'identité du bactériophage ;
- le caractère lytique de ce dernier ;

- l'absence de possibilité d'intégration du génome du bactériophage dans le génome bactérien.

D'autres méthodes permettent de confirmer l'absence de bactériophages tempérés : « *prophage induction method* », comme le test à la mitomycine C ou l'irradiation par ultraviolet (UV) (31,62,63). Il est également nécessaire de vérifier l'absence de gènes codant pour des toxines bactériennes (la toxine du syndrome de choc toxique, la toxine exfoliative et la leucocidine de Pantone-Valentine par exemple si on s'intéresse aux phages ciblant *Staphylococcus*) ou des gènes de résistance aux antibiotiques ;

- **la pureté de la matière première-substance active** : les impuretés provenant du procédé de fabrication doivent être réduites au maximum : ADN bactérien, débris bactériens, protéines bactériennes, additifs du processus de fabrication, solvants... Pour certaines impuretés, les concentrations maximales résiduelles tolérées sont définies, comme par exemple :
 - Selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur les biothérapies, la concentration en ADN résiduel issu de la cellule hôte doit être inférieure à 10 ng/dose. Par analogie, cette concentration paraît acceptable comme valeur maximale tolérée en ADN bactérien résiduel (40).
 - Certains additifs sont déjà utilisés comme excipients pour la formulation de médicaments ayant une AMM et dont nous connaissons le profil de tolérance. Ainsi, il suffit de vérifier la concentration maximale tolérée de cette molécule dans un médicament et de la comparer à celle présente dans les préparations de bactériophages.
- **la concentration en endotoxines de la matière première-substance active** : la limite en endotoxines est fonction de la posologie, de la voie d'administration et de la masse corporelle du patient. Dans la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition, deux parties traitent des endotoxines bactériennes : la Monographie 2.6.14 « Endotoxines bactériennes » et le chapitre général 5.1.10. « Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes ». Pour certaines voies d'administration, la limite maximale en endotoxines autorisée est spécifiée. Par exemple, la Ph. Eur. exige un contrôle des endotoxines bactériennes pour les préparations parentérales par voie IV avec une limite de 5 UI (Unités Internationales)/kg (poids corporel du patient)/h (si perfusion > 1 heure) ;
- **la stérilité de la matière première-substance active** (non exigée) : **test de stérilité**. La Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définit le mode opératoire. La réalisation, à la réception des préparations de bactériophages, d'une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à 0,22 µm et un SteritestTM peut être envisagée.
- **dans le cas d'une matière première-substance active non stérile : contrôle microbiologique**. Les Monographies 2.6.12 et 2.6.13 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définissent le mode opératoire de ce contrôle. Il s'agit de l'essai de dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Les critères d'acceptation en fonction des voies d'administration sont décrits dans le chapitre général 5.1.4 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition. Dans le cas de substances actives non stériles pour usage pharmaceutique les critères d'acceptation de la qualité microbiologiques sont :

- DGAT 10³ Unité formant colonie (UFC)/g ou UFC/mL
- DMLT 10² UFC/g ou UFC/mL ;
- **le titre de la matière première-substance active** : la détermination de ce titre doit être réalisée selon une procédure standardisée (cf. IV.3.b) ;
- **les données de stabilité de la matière première-substance active** ;
- **le volume extractible de la matière première-substance active** ;
- **le conditionnement de la matière première-substance active** ;
- **le pH de la matière première-substance active** : proche de la neutralité pH (6.0 à 8.0).

Il convient de rappeler, qu'il est de la responsabilité du fabricant de réaliser les tests énumérés ci-dessus sur la substance qu'il met à disposition. Le pharmacien hospitalier contrôle ensuite les informations présentes dans le dossier qualité.

Il est possible que certaines de ces informations ne soient pas fournies par le fabricant, ou soient données de manière incomplète ou avec un degré d'incertitude. **Dans ce contexte, chacune de ces informations doit être évaluée selon :**

- **la voie d'administration choisie,**
- **la posologie,**
- **la formulation,**
- **la situation du patient en tenant compte du rapport bénéfice/risque estimé.**

Si nécessaire, le pharmacien hospitalier demandera des informations complémentaires aux fabricants, comme par exemple la concentration résiduelle en impuretés, des données supplémentaires sur la caractérisation de bactériophages.

Le pharmacien pourra également solliciter des experts externes pour une évaluation collégiale de la qualité pharmaceutique de la matière première. En effet, alors que certains tests, tels que la définition du pH, de la concentration en endotoxines, ou la filtration stérilisante, peuvent être aisément réalisés au sein d'une PUI, il n'est pas du ressort du pharmacien de séquencer l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la matière première afin de s'assurer de l'absence de bactériophages tempérés. L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus d'évaluation de la qualité des suspensions-lyophilisats de bactériophages (cf. Contacts ANSM, page 25)

Dans le cas de substances actives ou de préparations de bactériophages fabriquées par l'HMRA : il s'agit d'une production réalisée au sein d'un établissement de santé conformément à une Monographie générale des bactériophages nationale belge. Ainsi l'évaluation de la qualité pharmaceutique sera réalisée à l'aide des données du certificat d'analyse du lot fourni par HMRA

L'Annexe 3 et l'Annexe 4 résument les modalités de contrôle des MPUP selon le circuit d'approvisionnement.

IV.4.b **La préparation et le contrôle de la qualité pharmaceutique**

Après avoir validé la qualité pharmaceutique de la matière première grâce au bulletin de contrôle fourni par le fabricant (cf. infra), **le pharmacien hospitalier doit réaliser des étapes de préparation** (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) conformément aux BPP au sein de la PUI, ainsi qu'un **contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale (ou hospitalière) de bactériophages préparée**, afin de permettre une administration chez l'homme.

◇ **La préparation : optimisation-définition de la formulation galénique, mise en forme pharmaceutique**

Le pharmacien a la responsabilité de la décision de la réalisation des préparations (19). Une évaluation de la valeur ajoutée et de la faisabilité technique de la préparation est réalisée par le pharmacien de la PUI.

La valeur ajoutée est estimée en considérant pour chaque préparation notamment :

- l'intérêt pharmaco-thérapeutique ;
- la meilleure acceptabilité possible pour une observance renforcée ;
- l'appréciation du bénéfice/risque.

La faisabilité technique est estimée en considérant pour chaque préparation :

- la présence des procédures générales et de modes opératoires ;
- la présence de matériel et locaux conformes à la réalisation de la forme pharmaceutique ;
- la présence d'un personnel formé ;
- une analyse de la formule de la préparation (19).

L'étape de **préparation au sens pharmaceutique du terme**, c'est-à-dire la **mise en forme pharmaceutique, la reconstitution, la dilution, à partir des matières premières de bactériophages produites en quantité suffisante par un fabricant**, doit donc être **réalisée au sein d'une PUI**, sous la responsabilité d'un pharmacien, en respectant les BPP (19). Des mesures particulières de protection de l'environnement et des personnes doivent être appliquées (cf. V.2.b).

Les étapes de préparation peuvent comporter :

- **l'optimisation de la formule** afin d'**assurer une meilleure biodisponibilité** ;
- **la mise en forme pharmaceutique** (dilution, reconstitution, mélange de plusieurs suspensions de bactériophages, préparation en seringues, poches) **afin de « faciliter » l'administration** de la suspension de bactériophages (28,31,64–70).

Dans ce cas, le pharmacien réalise une préparation magistrale (ou hospitalière) de bactériophages à partir de matières premières (suspensions-lyophilisats) produites par un fabricant-développeur.

La formulation d'une préparation est fondamentale. Elle permet de définir les **caractéristiques physico-chimiques et galéniques** d'une préparation au regard de la voie d'administration choisie, dans le but d'optimiser les paramètres pharmacocinétiques d'une substance, tout en garantissant l'efficacité et la sécurité du traitement. Au vu des caractéristiques pharmacocinétiques des bactériophages, un des objectifs de la formulation est **d'assurer la meilleure biodisponibilité** de ces derniers au site infectieux afin de permettre l'amplification virale.

La stabilité de la préparation doit également être maîtrisée. La voie d'administration doit donc permettre de concentrer les bactériophages au niveau du site infecté tout en restant compatible avec les caractéristiques pharmaceutiques des cocktails de bactériophages.

Ainsi, l'administration locale de bactériophages pourrait être considérée comme la plus sécuritaire selon les données disponibles avec l'avantage de connaître la quantité de bactériophages délivrée au site de l'infection. Cependant, une telle voie d'administration ne peut pas constituer une réponse au traitement d'infections systémiques pour lesquelles la voie intraveineuse (IV) ou orale pourrait être envisagée. Mais la quantité de bactériophages délivrée au niveau systémique après administration par voie orale ou à travers les muqueuses reste incertaine.

De même, le volume de distribution des bactériophages étant méconnu, l'administration par voie IV serait une approche permettant de connaître directement la quantité de bactériophages délivrée dans la circulation sanguine, mais sans toutefois connaître la quantité de bactériophages au site de l'infection.

Lors du CSST du 21 mars 2019, il a été admis par l'ensemble des experts que la voie orale était exclue. En effet, il est difficile de prédire un niveau d'activité suffisant sur la cible bactérienne via cette voie d'administration qui implique une absorption intestinale avec possible perte/dégradation. Il a également été admis que la voie intrathécale devait être exclue *a priori*, mais pourrait être à considérer sous réserve de garanties suffisantes sur la qualité (notamment microbiologiques et apyrogénicité) des préparations de bactériophages (13).

Différents risques sont à considérer lors des étapes de préparation - administration de la suspension de bactériophages :

- le risque d'adsorption au niveau du matériel de préparation et des DM utilisés pour la préparation et l'administration des bactériophages ;
- le risque de dégradation des bactériophages au niveau du site d'administration, au cours de l'administration, ce risque étant spécifique de la voie d'administration ;
- la problématique d'inactivation des bactériophages par l'acidité gastrique en cas d'administration par voie orale ;
- la sensibilité au pH, à la température ;
- la concentration en endotoxines, la stérilité de la préparation (3,9,27)...

Les bactériophages sont des virus, par conséquent ils sont sensibles à la température, aux conditions acides (pH = 4 et inférieur) et basiques (pH = 11 et supérieur) (44).

Ainsi, l'équipe hospitalière déterminera la voie d'administration, la composition de la solution en principe actif et excipients (titre/concentration...), la forme galénique ainsi que les DM utilisés lors de l'administration (en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques et techniques des DM). A noter, que la dose de bactériophages à administrer dépendra de la voie d'administration envisagée et de l'inoculum bactérien.

A titre d'exemple, dans le cas d'une nébulisation de suspension de bactériophages, il faut considérer (64–66) :

- le système de nébulisation : nébuliseur pneumatique, nébuliseur à plaques vibrantes (il est recommandé d'éviter les nébuliseurs ultrasoniques et d'utiliser préférentiellement les nébuliseurs à plaques vibrantes pour lesquels le recul en matière de tolérance (pour les bactériophages) semble être le plus positif) ;
- le circuit de nébulisation : l'interface avec le patient c'est-à-dire le type d'embout, les caractéristiques physico-chimiques et techniques de la tubulure soit les matériaux, la longueur, le diamètre ;
- la taille des gouttelettes nébulisées ;
- le rendement du titre de bactériophages à la sortie du nébuliseur ;
- la durée de la nébulisation au regard des données de stabilité de la suspension de bactériophages ;
- l'ajout d'excipient(s) : il est recommandé d'ajouter des tensio-actifs dans la préparation pour nébulisation.

◇ **Contrôle de la qualité pharmaceutique des préparations terminées de bactériophages produites par la PUI**

L'évaluation de la qualité pharmaceutique des préparations pharmaceutiques terminées de bactériophages (préparations magistrales ou hospitalière) est un prérequis indispensable à

l'administration. En effet, le pharmacien doit s'assurer que les différentes étapes de préparation, ainsi que l'étape d'administration, ne sont pas à l'origine d'une dégradation – altération de la substance active telle qu'une diminution du titre, une inactivation des bactériophages, ou toutes autres altérations de la qualité pharmaceutique (II.4.1). De plus, il doit démontrer que le développement de la forme pharmaceutique est conforme à l'indication (dose...).

Selon les données de la littérature relatives aux préparations de bactériophages et notamment de l'équipe l'HMRA, une liste de contrôles qualité devant être réalisés sur les préparations (magistrales ou hospitalières) de bactériophages préparées par la PUI a été définie (30,31,39). Pour chaque contrôle, les éléments suivants devront être détaillés : les référentiels utilisés (exemple Pharmacopée européenne, monographie nationale), les méthodes analytiques, les critères d'acceptation. Ces contrôles devront être réalisés au sein d'un environnement parfaitement maîtrisé en termes de contamination microbienne, particulaire et pyrogène (zone à atmosphère contrôlée, ZAC...), conformément à la réglementation en vigueur (Pharmacopée européenne, BPP...).

Les informations et contrôles listés ci-dessous sont indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des préparations terminées de bactériophages préparées par la PUI :

- **le titre de la préparation.** De manière empirique, il est admis que le titre d'une préparation de bactériophages doit être au moins égal à 10^8 - 10^9 PFU/ml (71). La détermination de ce titre doit être réalisée selon une procédure standardisée (cf. IV.3.b) ;
- **la MOI (multiplicity of infection),** rapport du nombre de bactériophages sur le nombre de bactéries mis en présence, est un des paramètres qui conditionne le niveau d'efficacité de l'infection virale. Or ce dernier, facilement maîtrisable *in vitro*, est très difficile à appréhender précisément *in vivo*. Il est admis de manière empirique que la MOI devrait se situer entre 10 et 0,1 (10,72) ;
- **les données de stabilité :** la stabilité du mélange si ajout d'excipient(s), stabilité dans le contenant final, lors de l'administration ;
- **selon le caractère stérile ou non de la préparation :** l'exigence relative à la stérilité de la préparation sera fonction de la voie d'administration et du produit (cf. Annexe 5) (66).
- selon la Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition la préparation devra être stérile :
 - lors notamment d'administration par voies parentérale, ophtalmique ou intra-mammaire, et certaines préparations pour inhalation ou irrigation intra-utérine,
 - lorsque le risque de passage systémique des bactériophages est majeur (par exemple : intégrité de la barrière cutanée gravement atteinte dans le cas d'une peau gravement lésée ou d'une plaie profonde).

Dans le cas d'une préparation stérile : test de stérilité. La Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définit le mode opératoire. La réalisation, à la réception des préparations de bactériophages, d'une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à 0,22 µm et un SteritestTM peut être envisagée ;

Dans le cas d'une préparation non stérile : contrôle microbiologique des préparations non stériles. Les Monographies 2.6.12 et 2.6.13 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définissent le mode opératoire de ce contrôle. Il s'agit de l'essai de dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Les critères d'acceptation en fonction des voies d'administration sont décrits dans le chapitre général 5.1.4 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition.

- **le pH** : proche de la neutralité (6.0 à 8.0) ;
- **l'apparence visuelle** ;
- **le volume extractible** ;
- **le conditionnement.**

Chacune de ces informations doit être évaluée selon :

- **la voie d'administration choisie** ;
- **la posologie** ;
- **la formulation** ;
- **et au regard de la situation du patient en tenant compte du rapport bénéfice/risque pouvant être prédisposé.**

L'Annexe 5 détaille les exigences relatives à la qualité pharmaceutique des préparations terminées en fonction de la voie d'administration conformément à la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition.

Le pharmacien pourra solliciter des experts externes pour une évaluation collégiale de la qualité pharmaceutique de la préparation ou externaliser certains contrôles (exemple : titration...).

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus d'évaluation de la qualité des préparations de bactériophages (cf. Contacts page 25).

IV.5 Évaluation du projet d'administration de bactériophages thérapeutiques

Une discussion collégiale autour du cas doit être menée avec l'équipe clinique en charge du patient, et l'ANSM avec une possible sollicitation d'experts ponctuels externes. Une évaluation rigoureuse :

- du cas clinique ;
- de la voie d'administration des bactériophages et de la posologie envisagée ;
- de la qualité pharmaceutique des préparations de bactériophages disponibles doit être réalisée.

Pour ce faire l'évaluation doit s'appuyer sur les données de la littérature, l'histoire clinique et thérapeutique du patient, les données microbiologiques, les résultats du phagogramme (une fois obtenus), les données relatives à la qualité des préparations de bactériophages. L'utilisation thérapeutique des bactériophages doit être considérée au regard du rapport bénéfice/risque. Elle ne doit être envisagée que si l'utilisation des bactériophages est susceptible de présenter un bénéfice pour le patient.

Il est nécessaire de disposer du consentement libre, éclairé, formel, écrit du patient ou de la personne de confiance ou bien des titulaires de l'autorité parentale dans le cas d'un patient mineur. Les bénéfices escomptés et les risques prévisibles doivent être expliqués de façon claire et loyale au patient et/ou à la famille.

IV.6 Association thérapeutique bactériophages - antibiotiques

A ce jour, l'utilisation des bactériophages est empirique, aucune étude menée selon les standards de qualité méthodologique requis, n'a démontré l'efficacité des bactériophages utilisés seuls dans le traitement des infections bactériennes.

Lors de leur utilisation thérapeutique, les bactériophages doivent venir en support de l'action des antibiotiques. Il est donc indispensable d'associer des antibiotiques lors de l'administration de bactériophages (poursuite de l'antibiothérapie initiée antérieurement) lorsque cela présente un intérêt ou une efficacité, même jugée minimale en cas d'antibiorésistance.

Il apparaît qu'à côté de la lyse bactérienne provoquée directement par les bactériophages, ceux-ci pourraient aussi contribuer à une meilleure efficacité des antibiotiques. Dans la littérature, des études ont mis en évidence une synergie entre bactériophages et antibiotiques (29,54,73).

Enfin, en raison du spectre d'action étroit des bactériophages, les autres espèces présentes au niveau du foyer infectieux doivent être couvertes par une antibiothérapie adaptée le cas échéant.

Il demeure aujourd'hui que la place des bactériophages par rapport aux antibiotiques n'a pas été définie.

La stratégie d'utilisation des bactériophages selon les indications reste à valider :

- en complément de l'antibiothérapie ? d'une chirurgie ?
- selon une utilisation isolée de bactériophages dans le cas notamment d'infections dues à des bactéries multi-résistantes ?

V Les modalités pratiques d'utilisation des bactériophages

V.1 Le transport et le stockage des différentes formes de bactériophages

Comme indiqué précédemment (cf. III.6.c), les bactériophages thérapeutiques appartiennent au groupe 1 de la classification des agents biologiques (28,44). Ainsi lors de leur transport, il n'est pas nécessaire de prescrire les règles de transport appliquées aux produits biologiques dangereux (c'est-à-dire celles appliquées aux produits biologiques classés 2814, 2900 et 3373) (48).

Le transport des bactériophages doit être sécurisé et conforme :

- soit aux Bonnes Pratiques de distribution des substances actives des médicaments à usage humain pour les matières premières unitaires produites par le fabricant ;
- soit aux Bonnes Pratiques de distribution en gros des médicaments à usage humain pour les préparations pharmaceutiques, magistrales ou hospitalières, préparées par une PUI.

A titre indicatif, les suspensions de bactériophages se conservent entre 2-8 °C (74,75). Un suivi des températures pendant le transport à l'aide d'une sonde est indispensable pour garantir la qualité des suspensions. Le transporteur doit être en mesure de fournir la traçabilité du suivi des températures.

Les suspensions de bactériophages (matières premières-préparations magistrales) pourront donc être stockées dans la zone réfrigérée de la PUI, sans mesure spécifique de protection de l'environnement supplémentaire.

V.2 Les modalités de manipulation des bactériophages

La manipulation des suspensions-lyophilisats de bactériophages, lors des étapes de préparation - reconstitution pharmaceutique en PUI ou lors de la réalisation du phagogramme, doit être réalisée au sein d'un environnement contrôlé : contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air. Les locaux et le matériel doivent être conçus et entretenus de façon à convenir au mieux aux opérations à effectuer et doivent permettre de minimiser tous les risques potentiels pour l'environnement et les personnes.

La manipulation des bactériophages est couverte par la directive européenne 2000/54/CE du Parlement Européen et du conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (76).

V.2.a **Le phagogramme**

Les conditions de réalisation du phagogramme sont fonction de la **virulence de la bactérie utilisée pour isoler le bactériophage d'intérêt** (utilisé comme témoin positif) et de **celle de la souche bactérienne (isolat du patient) à tester**. Il s'agit dans l'immense majorité des cas de pathogènes de classe 2.

La **réalisation du phagogramme** doit avoir lieu, en conditions stériles, au sein d'**un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II**. Il est recommandé d'utiliser des cônes avec filtres pour éviter la contamination des micropipettes.

Les membres du CSST du 21 mars 2019 ont insisté sur l'importance de pratiquer systématiquement le phagogramme, avec le calcul de l'EOP et la réalisation de cinétique de lyse bactérienne. Il a été évoqué l'intérêt de tester plusieurs isolats (d'une même espèce bactérienne) d'un ou de prélèvements peropératoires pour rechercher s'il existe des phénotypes différents de sensibilité bactérienne aux phages, le nombre d'isolats à tester restant à déterminer (13). Cependant, il semble non utile de réaliser un calcul d'EOP sur une souche dont le phagogramme par technique du sur-spot montre une résistance, de même qu'une cinétique de lyse.

Il ne s'agit pas d'une étape réalisée sous la responsabilité pharmaceutique, elle peut être réalisée dans un laboratoire de microbiologie. Un phagogramme est réalisé sur décision médicale, par un laboratoire de biologie médicale qualifié pour ce diagnostic. Le biologiste assure la responsabilité de cet acte qui inclut le prélèvement, l'exécution de l'analyse, la validation des résultats, et si nécessaire leur confrontation avec les données cliniques et biologiques des patients.

V.2.b **Les étapes de préparation**

Les conditions de réalisation des étapes de préparation (optimisation de la formule, reconstitution...) **dépendent des exigences en termes de qualité pharmaceutique** du produit fini (exigences de stérilité...).

Différentes modalités de préparations sont possibles :

- une étape de reconstitution lors de la mise à disposition de lyophilisat de bactériophages ;
- la mise en forme pharmaceutique, par exemple : mélange de plusieurs suspensions dans une seringue afin d'obtenir un cocktail de plusieurs bactériophages.

Dans le cas de préparations stériles (application sur une peau gravement atteinte ou dans une cavité articulaire, préparation pour nébulisation, cf. Annexe 5), **les étapes de préparation** doivent avoir lieu au sein d'**une ZAC**, dans des enceintes spécifiques, conformément aux BPP :

- **soit un environnement clos, un isolateur,**
- **soit un PSM de type II.**

Selon les BPP, l'isolateur devra répondre aux exigences de la classe A en terme de qualité microbiologique et particulière de l'air, l'environnement immédiat sera conforme aux exigences de la classe D selon les BPP (27,28,31).

Si l'environnement n'est pas un espace clos, c'est à dire un poste à flux d'air laminaire (PSM de type II), alors l'environnement immédiat du flux doit répondre aux exigences de la classe B en terme de qualité microbiologique et particulière de l'air, selon les BPP (27,28,31).

Il existe trois principaux procédés de préparation de médicaments stériles :

- - la stérilisation terminale ;
- - la filtration stérilisante ;
- - la préparation aseptique.

Cependant, la stérilisation terminale n'est pas envisageable car elle entraînerait une destruction des bactériophages. Ainsi, si l'exigence de stérilité est requise pour le produit fini, deux procédés peuvent être envisagés lors de la préparation, selon les BPP :

- la filtration stérilisante, avec un type de filtre reconnu satisfaisant, en conformité avec les exigences de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition, c'est-à-dire un filtre à 0,22 µm en poly-ether-sulfone (PES), dont on choisira le modèle possédant le plus faible espace mort. De façon importante, il est à noter que les filtres en esters/acétate de cellulose ne doivent pas être utilisés puisqu'il s'agit de filtres sur lesquels s'adsorbent massivement les phages ;
- la préparation aseptique (si et seulement si, la matière de départ utilisée est déclarée stérile, avec résultats de tests à l'appui).

Les précautions d'habillement sont similaires à celles préconisées lors de la réalisation de préparations stériles (cf. Tableau II).

Tableau II. Précautions d'habillement lors de la réalisation de préparations stériles

	Isolateur	PSM
Habillement	Tenue adaptée propre - Charlotte - Surchausses - Gants non stériles - Masque chirurgical	- Chaussures ou bottes stériles - Casaque stérile resserrée aux poignets - Gants stériles - Masque FFP2

En pratique, lors de la manipulation des bactériophages, le nettoyage et la désinfection des instruments et des surfaces peuvent être réalisés avec des détergents – désinfectants de surface biocide, tels que ceux utilisés en routine en milieu de soin, de type Surfa'safe Anios® (cf. V.3).

Les déchets sont traités via la filière de déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés (DASRI).

V.3 Les mesures d'hygiène et de protection liées à la manipulation des préparations de bactériophages

Compte tenu du caractère atypique des bactériophages, il est vivement recommandé d'informer au sein des établissements de santé : la direction, l'Equipe Opérationnelle d'hygiène (EOH) et la direction des soins infirmiers (DSI) de l'administration de bactériophages.

Les bactériophages sont des virus nus, par conséquent ils sont sensibles à la température (une température supérieure à 80 °C permet d'inactiver les bactériophages), aux conditions acides (pH = 4 et inférieur) et basiques (pH =11 et supérieur) (44).

En pratique, lors de la manipulation des bactériophages, le nettoyage et la désinfection des instruments et des surfaces peuvent être réalisés avec des détergents - désinfectants de surface biocides classiques, tels que ceux utilisés en routine en milieu de soin, présentant les propriétés suivantes (77,78) :

- bactéricide conformément à la norme NF EN 1040, NF EN 13727
- fongicide ou levuricide conformément à la norme NF EN 1275, NF EN 13624
- sporicide conformément à la norme NF EN 14347,
- virucide conformément à la norme NF EN 14476 + A1.

Les produits actifs sur les virus sont détaillés dans la **Figure 6**.

[Tableau 1] Estimation des activités biocides des principales substances actives [5, 6]

	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Moisissures	Levures	Virus	ATNC
	Gram +	Gram -						
Acide peracétique								
Ammonium quaternaire								
Biguanide (PHMB)			NP		NP	NP		
Ethanol								
Glutaraldéhyde					(1)	(1)		
Hypochlorite de sodium (eau de Javel)								(2)
Peroxyde d'hydrogène								

très bonne activité
 bonne activité
 activité moyenne
 aucune activité
 fixe fortement l'infectiosité
 NP : non précisé
 (1) : activité inconstante. (2) : à la concentration optimale de 2% de chlore actif.

Figure 6. Estimation des activités biocides des principales substances (78)

Ewan M. Clark *et al.* ont démontré que l'eau de javel (0.5% [vol/vol]) entraînait une réduction du titre de bactériophages de 7-log₁₀ (79).

A titre d'exemple, le produit de type Surfa'safe Anios® présente les propriétés précédemment citées conformément aux normes, il est donc actif sur les virus nus de type bactériophages. A noter que le détergent-désinfectant, Oxy'floor Anios®, actifs sur les spores de *Clostridium difficile* permet de gagner en couverture de virus nus de 1 à 2%.

Lors de la manipulation des bactériophages, un lavage des mains avec de l'eau et du savon doux est recommandé (80).

Il est également important de prendre en compte le matériel utilisé lors de l'administration au patient. Dans la mesure du possible, il est préférable d'utiliser du matériel à usage unique. Sinon, il faut se renseigner sur une possible stérilisation du matériel. Briers *et al* ont montré que l'activité des bactériophages FKZ anti-*P. aeruginosa* diminue progressivement de 100% à 0% lorsque ces derniers sont exposés à des températures allant de 25 à 90 °C pendant 60 min (81).

Les cycles conventionnels d'autoclavage par chaleur humide utilisés en routine dans les établissements de soins (cycle classique de 121 °C pendant 30 minutes ou cycle ATNC de 134 °C pendant 18 minutes) sont parfaitement efficaces pour l'inactivation des bactériophages.

V.4 Les modalités d'administration des bactériophages

En l'absence de recommandations et de données à ce jour, les précautions standard doivent être appliquées lors du soin.

Le nettoyage et/ou la désinfection de l'environnement proche du patient (table de chevet, adaptable, lit...), des surfaces fréquemment utilisées (poignées de porte, sanitaires...) ainsi que des locaux (sols, surfaces) seront réalisés selon les modalités définies au chapitre V.3 et en conformité avec les procédures locales.

V.5 Le financement des préparations de bactériophages

Selon l'article L. 5123-2 du Code de la santé publique (CSP), les ATU nominatives et ATU de cohorte sont réputées inscrites à la liste des collectivités et sont prises en charge par l'assurance maladie (82). Lorsque la mise à disposition des bactériophages est réalisée dans le cadre d'une ATU nominative, ces spécialités sont inscrites sur la liste dite « liste des médicaments facturables en sus des prestations d'hospitalisation » ou « liste en sus ». Ceci permet aux établissements de facturer à l'assurance maladie les préparations de bactériophages en sus des tarifs des groupes homogènes de séjour (GHS) et d'obtenir leur remboursement à 100%.

Si les suspensions-lyophilisats de bactériophages sont considérées comme des matières premières alors leur coût sera intégré dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

Le coût de réalisation de la partie « préparation magistrale pharmaceutique » devra être ajouté et sera intégré dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

Le phagogramme ainsi que les autres tests nécessaires au diagnostic et à la prescription peuvent être, par assimilation avec les antibiogrammes, facturés aux établissements de santé, leurs coûts seront intégrés dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

VI Conclusion

Aujourd'hui, la mise à disposition précoce de suspension de bactériophages ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel. En effet, ces suspensions de bactériophages ne disposent actuellement d'aucune AMM qui permettrait une utilisation thérapeutique de routine selon les indications reconnues dans les AMM qui pourraient être envisagées. Le seul producteur industriel de bactériophages en France est Pherecydes Pharma[®], promoteur de l'essai clinique Phagoburn. Il dispose de bactériophages contre certaines souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ainsi, au-delà de ces bactériophages, afin de traiter des infections dues à d'autres germes, il a fallu recourir, à titre dérogatoire et dans le cadre d'utilisation compassionnelle, à l'importation de suspensions-lyophilisats de bactériophages, produites par l'HMRA en Belgique ; suspensions – lyophilisats sous forme unitaire que les PUI, d'où émane la prescription d'une phagothérapie compassionnelle, doivent alors préparer pour permettre une administration sécurisée.

Un rapide tour d'horizon des capacités de production de suspensions-lyophilisats de bactériophages sous forme unitaire (matière première), des capacités de phagothèque élargies pour permettre de sélectionner un phage pertinent pour l'infection résistante, montre que les ressources en France sont très limitées. Dans ce contexte, il est important d'élargir les possibilités de mise à disposition des bactériophages en France avec notamment une production de suspension-lyophilisats de bactériophages personnalisés (pour répondre à diverses souches bactériennes infectieuses résistantes) sur le territoire national. L'ANSM encourage fortement le développement d'une production académique de bactériophages, sur le même modèle que l'HMRA en Belgique ou d'autres pays Européens. De plus, la création d'une « phagothèque » ou « banque de bactériophages » doit être discutée. Elle augmenterait considérablement le nombre et la diversité des bactériophages disponibles. Il serait possible, une fois les recommandations publiées sur les exigences en matière de production et de contrôle de la qualité pharmaceutique, de mettre à disposition des sites de production, des bactériophages caractérisés, lytiques, dont le niveau de sécurité serait adapté à une utilisation en pratique clinique. Cette phagothèque serait enrichie à chaque isolement-identification-caractérisation d'un bactériophage pour un patient donné. Ces bactériophages stockés en banque seraient ensuite disponibles pour être utilisés chez d'autres patients.

Au regard des perspectives d'utilisation de la phagothérapie dans les situations exceptionnelles de résistance, il apparaît que l'approche personnalisée « à la demande » et « sur mesure » est vraisemblablement la plus adaptée/efficace pour cibler un pathogène résistant aux autres approches thérapeutiques. A ce jour, il demeure que les différentes suspensions de bactériophages disponibles ne sont pas de qualité standardisée. Cependant, certains textes existants sur les produits biologiques et publications,

comme la Monographie nationale belge, pourraient être utilisés pour la mise en place de procédure de production et de contrôle et permettre ainsi l'évaluation de la qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages unitaires disponibles (c'est-à-dire matière première-substances active).

Les questions de la démonstration de l'efficacité clinique et des schéma thérapeutiques optimaux des bactériophages se posent. Il n'existe pas de prérequis définis selon les standards actuels d'évaluation pour asseoir une démonstration clinique de la phagothérapie. Il est fondamental de définir les objectifs cliniques et la méthodologie des futurs essais afin de ne pas faire perdurer l'empirisme de cette thérapeutique et ainsi obtenir des données sur l'efficacité et la tolérance des bactériophages. La phagothérapie doit faire l'objet d'une évaluation approfondie et rigoureuse.

Enfin, comme précisé en préambule, ce guide n'a pas pour objet de se substituer au contenu d'un dossier d'AMM et aux évaluations au cas par cas de l'ANSM. Il sera amené à évoluer selon la législation, les recommandations européennes et françaises, les données issues des retours d'expériences des praticiens et les résultats des études précliniques et cliniques.

VII Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFMPS : Agence fédérale des médicaments et des produits de santé
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
API : active pharmaceutical ingredient
ARN : Acide ribonucléique
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
BHRe : Bactérie hautement résistante aux antibiotiques émergente
BMR : Bactérie multirésistante aux antibiotiques
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
BPP : Bonnes pratiques de préparation
CA : Certificat d'analyse
CHMP : Committee for Medicinal Products for Human Use
CEP : Certificat de conformité aux monographies de la Pharmacopée européenne
CSP : Code de la santé publique
CSST : Comité scientifique spécialisé temporaire
DASRI : Déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés
DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux
DM : Dispositif médical
DMLT : Dénombrement des moisissures/levures totales
DSI : Direction des soins infirmiers
EI : Effets indésirables
Etb : Établissement
EMA : European medicines agency (agence européenne du médicament)
EOP : Efficiency of Plaquing (paramètre d'activité d'un phage)
EOH : Équipe opérationnelle d'hygiène
FDA : Food and Drug Administration
GHS : Groupe homogène de séjour
HMRA : Hôpital militaire de la Reine Astrid
ICH : International Conference on Harmonisation
IV : Intraveineuse
JORF : Journal officiel de la République française
MTI : Médicaments de thérapie innovante
MOI : Multiplicity of infection (rapport entre le nombre de phages et le nombre de bactéries en présence)
MPUP : Matière première à usage pharmaceutique
OMS : Organisation mondiale de la santé
PFU : Plaque-forming units
PSM : Poste de sécurité microbiologique
PUI : Pharmacie à usage intérieur
PUT : Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations
RCP : Résumé des caractéristiques du produit
UFC : Unité formant colonie
UE : Union européenne
UV : Ultraviolet
ZAC : Zone à atmosphère contrôlée

VIII Définition des termes utilisés

Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) : Les bonnes pratiques de fabrication des médicaments constituent un des éléments de la gestion de la qualité qui garantit que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente, selon les normes de qualité adaptées à leur usage et requises par l'autorisation de mise sur le marché, l'autorisation d'essai clinique ou les spécifications du produit. Les BPF s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité. Le guide des BPF est destiné à servir de référence lors de l'évaluation des demandes d'autorisation de fabrication et lors de l'inspection des fabricants de médicaments (83).

Les principes des BPF et les lignes directrices particulières s'appliquent à toutes les opérations requérant les autorisations prévues aux articles 40 de la directive 2001/83/CE et 13 de la directive 2001/20/CE, tels qu'amendés (14,84). Ils s'appliquent également aux procédés de fabrication pharmaceutique, tels ceux, par exemple, mis en œuvre dans les établissements de santé.

Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) : Les bonnes pratiques de préparation constituent un des éléments de la gestion de la qualité qui garantit que les préparations pharmaceutiques sont fabriquées et contrôlées de façon cohérente, selon les normes de qualité adaptées à leur usage et leurs spécifications.

Les BPP s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité des préparations pharmaceutiques (19).

Fabrication - production : Toutes les opérations de réception des matières, de production, de conditionnement, de reconditionnement, d'étiquetage, de ré-étiquetage, de contrôle de la qualité, de libération, de stockage et de distribution des substances actives ainsi que les contrôles associés (83).

Dans le cas des bactériophages, les développeurs-fabricants produisent-fabriquent des suspensions-lyophilisats de bactériophages sous forme unitaire, il s'agit alors de matières premières. Les pharmaciens des pharmacies à usage intérieur (PUI) seront en charge de la préparation, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique : reconstitution, dilution de ces matières premières. Ainsi, des préparations magistrales (ou hospitalières) de bactériophages seront produites par la PUI pour un patient donné (ou plusieurs si préparations hospitalières, pour le traitement d'une infection bactérienne, à partir de ces matières premières.

Matière première à usage pharmaceutique : Tout composant utilisé dans la réalisation d'une préparation (substances actives, excipients, éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés chez l'homme ou à leur être administrés) (19).

Dans le cas de bactériophages, il s'agit de suspensions ou de lyophilisats sous forme unitaire, les « *active pharmaceutical ingredient* » (API), produits par un développeur-fabricant et issus d'un procédé de production qualifié et conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (83). Ces substances actives –

matières premières produites deviendront des matières de départ pour la réalisation de préparations magistrales voire hospitalières, par les PUI.

Préparation (acte de) : Terme désignant toutes les opérations de préparation et de conditionnement (y compris étiquetage et ré-étiquetage) (19). Le pharmacien a la responsabilité de la décision de la réalisation des préparations.

Les missions des PUI comportent notamment la préparation, le contrôle et l'approvisionnement des médicaments, conformément à l'article L.5126-5 du code de la santé publique (85). Les opérations de préparation suivent des instructions et des procédures définies. Elles répondent aux principes des bonnes pratiques de préparation (BPP) en vue d'obtenir des préparations de la qualité requise. Les spécificités de la préparation sont définies dans le dossier de préparation. Une préparation n'est entreprise que si le pharmacien responsable de cette activité possède les moyens appropriés spécifiques (équipements, matériels, personnels, locaux...) pour la réaliser et la contrôler.

Préparation pharmaceutique : Médicament, généralement constitué de substance(s) active(s) éventuellement combinées à un/des excipient(s), qui est formulé et mis en forme pharmaceutique de façon à être adapté à l'usage qui en est prévu, si nécessaire après reconstitution, et qui est présenté dans un récipient approprié, convenablement étiqueté. Une préparation pharmaceutique est réalisée pour les besoins spécifiques d'un ou plusieurs patients conformément à la législation. Les préparations pharmaceutiques se divisent en 2 catégories :

- les préparations extemporanées, qui sont préparées individuellement pour un patient ou un groupe de patients spécifique et délivrées après leur préparation ;
- les préparations stockées, qui sont préparées à l'avance et conservées jusqu'à réception d'une demande de délivrance (19).

Le Code de la Santé Publique (CSP) décrit 3 sortes de préparations : préparation magistrale, préparation hospitalière et préparation officinale (Article L.5121-1 du CSP) (86).

Préparation terminée : Médicament qui a subi tous les stades de la réalisation de la préparation, y compris le conditionnement final (19).

Produit fini : Médicament qui a subi tous les stades de la fabrication, y compris le conditionnement.

Les produits finis, fabriqués par un établissement pharmaceutique, contiennent des principes actifs pharmaceutiques conformes à la formule qualitative et quantitative de l'autorisation de mise sur le marché (AMM), ou de l'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) ou de l'autorisation d'essai clinique. Ils ont la pureté requise, sont contenus dans l'emballage correct et sont correctement étiquetés.

La préparation – mise en forme pharmaceutique (reconstitution...) de ces produits finis sera conforme au résumé des caractéristiques du produit (RCP) dans le cadre d'un produit disposant d'une AMM, ou au protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations (PUT) pour un médicament sous ATU (83).

Reconstitution : Manipulation permettant l'utilisation ou l'administration d'un médicament. Les médicaments disposant d'une AMM, délivrée par une agence de sécurité du médicament compétente, sont reconstitués conformément aux instructions figurant dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) ou dans la notice d'information du patient, ou dans le protocole du médicament expérimental. Lorsqu'elle est réalisée en pharmacie, elle respecte les présentes BPP. La reconstitution des spécialités pharmaceutiques ou de médicaments expérimentaux est une opération de mélange simple notamment d'une solution, d'une poudre, d'un lyophilisat, etc. avec un solvant pour usage parentéral ou non (19).

La reconstitution des suspensions-lyophilisats de bactériophages « unitaires », qui disposent du statut de matière première, est une opération de mélange simple notamment d'une ou plusieurs suspensions, d'un ou plusieurs lyophilisats, pour former *in fine* un cocktail de bactériophages, avec un solvant pour usage parentéral ou non. La reconstitution des suspensions-lyophilisats de bactériophages doit être réalisée selon les dispositions définies dans les BPP (19).

IX Bibliographie

1. Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie: Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *médecine/sciences*. 2017;33(4):410-6.
2. Dufour N. Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité [Microbiologie]. Université Paris 7 – Paris Diderot; 2015.
3. Dublanche A. La phagothérapie. Des virus pour combattre les infections. *Renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques*. Lausanne: Favre SA; 2017. 247 p.
4. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2015;28(1):13-20.
5. Abedon ST. Bacteriophage Clinical Use as Antibacterial "Drugs": Utility and Precedent. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 1 août 2017 [cité 21 mai 2020];5(4). Disponible sur: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.BAD-0003-2016>
6. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 10 juin 2019;63(8):e00379-19, /aac/63/8/AAC.00379-19.atom.
7. Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;64(11):1582-8.
8. Bruttin A, Brüssow H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(7):2874-8.
9. 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*. 2016;4:124-37.
10. 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. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(1):35-45.
11. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009;34(4):349-57.
12. Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC urology*. 2017;17(1):90.
13. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Compte rendu de séance du comité spécialisé temporaire Phagothérapie – Retour d'expérience et perspectives. 2019 mars.
14. Commission européenne, 2001. Directive 2001/83/CE du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. *Journal officiel* n° L 311 du 28/11/2001 p. 0067–0128. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000518889>
15. Commission européenne, 2004. Directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. *Journal officiel* n° L 136 du 30/04/2004 p. 0034–0057. [Internet]. p. 0034–0057. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000520345&categorieL>

ien=id

16. Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(8):2071-4.
17. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Compte rendu de séance comité spécialisé temporaire Phagothérapie. 2016 mars.
18. Code de la santé publique. Article L.5111-1 relatif à la définition du médicament. Version en vigueur au 27 février 2007. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689867>
19. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Bonnes pratiques de préparation. Edition 2019 [Internet]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/70ab5faa689e8a46677e68e366a27f5c.pdf
20. Dublanchet A. Qu'est-ce que la phagothérapie ? *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale*. 2014;4(4):354-70.
21. Letarov A, Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107(1):1-13.
22. Méndez J, Audicana A, Cancer M, Isern A, Llana J, Moreno B, et al. Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *Journal of Water and Health*. 2004;2(3):201-14.
23. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(12):3677-86.
24. Ackermann H-W. Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2009;501:127-40.
25. Code de la santé publique. Article L.5111-2 relatif aux spécialités pharmaceutiques. Version en vigueur en 22 juin 2000. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689868&dateTexte=20120907>
26. Code de la santé publique. Article R5121-68 relatif aux demandes d'autorisation temporaire d'utilisation Version en vigueur au 21 janvier 2013. [Internet]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=28B6DF60676795CD3BB653C291BD20C1.tpdjo15v_1?idSectionTA=LEGISCTA000026968491&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20140430
27. General monograph – version 1.0 Phage active pharmaceutical ingredients. In.
28. Pirnay J-P, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G. Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2018;1693:233-52.
29. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. 2014;9(8):1-11.
30. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceyssens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The Magistral Phage. *Viruses*. 2018;10(2).
31. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS One*. 2009;4(3):1-10.
32. Pirnay J-P, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharmaceutical Research*. 2015;32(7):2173-9.
33. Commission européenne 2006. Directive 2006/17/CE de la Commission du 8 février 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au don, à l'obtention et au contrôle de tissus et de cellules

d'origine humaine. Journal officiel n° L 38 du 09/02/2006 p. 0040 - 0052 [Internet]. Disponible sur: [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:FR:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:FR:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:FR:PDF)

34. Commission européenne, 2006. Directive 2006/86/CE de la Commission du 24 octobre 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences de traçabilité, la notification des réactions et incidents indésirables graves, ainsi que certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution des tissus et cellules d'origine humaine. Journal officiel n° L 294 du 25/10/2006 p. 0032 [Internet]. Disponible sur: http://sfbct.free.fr/new/texte_documentation/7.pdf

35. Commission européenne 2004. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains. Journal officiel n° L 102 du 07/04/2004 p. 0048 - 0058. [Internet]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0023&from=LV>

36. European Medicines Agency. Note for guidance on Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. (CPMP/ICH/294/95). 2006;13.

37. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry- Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications [Internet]. 2010. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm202439.pdf>

38. Fauconnier A. Guidelines for Bacteriophage Product Certification. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2018;1693:253-68.

39. Merabishvili M, Pirnay J-P, De Vos D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol Biol*. 2018;1693:99-110.

40. World Health Organization. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814; 2013.

41. Mutti M, Corsini L. Robust Approaches for the Production of Active Ingredient and Drug Product for Human Phage Therapy. *Front Microbiol*. 8 oct 2019;10:2289.

42. Pr Dupon M. Phagothérapie dans les infections ostéo-articulaires. Octobre 2016. [Internet]. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/desc/2016/seminaire-octobre-2016/phagottt-16-09-pr-michel-dupon.pdf>

43. Standard Treatment Associated With Phage Therapy Versus Placebo for Diabetic Foot Ulcers Infected by *S. Aureus* - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02664740>

44. Verheust C, Pauwels K, Mahillon J, Helinski DR, Herman P. Contained use of Bacteriophages: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Applied Biosafety*. 2010;15(1):32-44.

45. Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A, Owczarek B, Wojas-Turek J, Kicielińska J, et al. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS ONE*. 2013;8(8):1-13.

46. Żaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Owczarek B, et al. Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1681):1-14.

47. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(5):317-27.

48. Venail P, Fresillon C, Pillaire MJ, Perrin E. Le cahier de prévention risque biologiques. 4ème édition. 2017;88.
49. Safety And Efficacy Of Bacteriophage Therapy: Analysis Of Clinical Case Series Data. Aslam, S., Gilbey, T., Maddocks, S., Morales, S., Lehman, S., Branston, S., Fabijan, A.P., Furr, C-L.L., Rosas, F., Bilinsky, I., Grint, P., Schooley, R.T., and Iredell, J. *Open Forum Infectious Diseases*. 2018 5(suppl_1): S47.
50. Gilbey T, Ho J, Cooley LA, Fabijan AP, Iredell JR. Adjunctive bacteriophage therapy for prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal of Australia*. 2019;211(3):142-143.e1.
51. Ooi ML, Drilling AJ, Morales S, Fong S, Moraitis S, Macias-Valle L, et al. Safety and Tolerability of Bacteriophage Therapy for Chronic Rhinosinusitis Due to *Staphylococcus aureus*. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 20 juin 2019;
52. Law N, Logan C, Yung G, Furr C-LL, Lehman SM, Morales S, et al. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*. 1 août 2019;47(4):665-8.
53. 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*. avr 2019;38(4):475-6.
54. 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):1-16.
55. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(5):2141-51.
56. Fong SA, Drilling A, Morales S, Cornet ME, Woodworth BA, Fokkens WJ, et al. Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7:418.
57. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2009;501:141-9.
58. 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*. 2015;10(3):1-13.
59. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 69-76. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7
60. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 77-80. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_8
61. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 81-5. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9
62. Miller RV. Methods for enumeration and characterization of bacteriophages from environmental samples. In: *Techniques in Microbial Ecology*. 1998. p. 218-35.
63. Adams MH. *Bacteriophages* [Internet]. New York, Interscience Publishers; 1959. 624 p. Disponible sur: <http://archive.org/details/bacteriophages00adam>

64. Hoe S, Semler DD, Goudie AD, Lynch KH, Matinkhoo S, Finlay WH, et al. Respirable Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Lung Infections. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2013;26(6):317-35.
65. Hoe S, Boraey MA, Ivey JW, Finlay WH, Vehring R. Manufacturing and Device Options for the Delivery of Biotherapeutics. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2013;27(5):315-28.
66. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(10):1253-64.
67. 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*. 2016;73(10):2901-3.
68. Ferry T, Leboucher G, Fevre C, Herry Y, Conrad A, Josse J, et al. Salvage Debridement, Antibiotics and Implant Retention (“DAIR”) With Local Injection of a Selected Cocktail of Bacteriophages: Is It an Option for an Elderly Patient With Relapsing *Staphylococcus aureus* Prosthetic-Joint Infection? *Open Forum Infectious Diseases*. 2018;5(11):1-4.
69. Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Encapsulation of Bacteriophage in Liposome Accentuates Its Entry in to Macrophage and Shields It from Neutralizing Antibodies. *PLoS One*. 2016;11(4):1-16.
70. Singla S, Harjai K, Raza K, Wadhwa S, Katare OP, Chhibber S. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistribution. *Journal of Virological Methods*. 2016;236:68-76.
71. Abedon S. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Advances in Applied Microbiology*. 2011;77:1-40.
72. Abedon ST. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*. 2016;6(3):1-6.
73. Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2012;65(2):395-8.
74. Clark WA. Comparison of Several Methods for Preserving Bacteriophages. *Appl Microbiol*. sept 1962;10(5):466-71.
75. Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Front Microbiol*. 2016;7:1177.
76. Commission européenne. Directive 2000/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE) *Journal officiel* n° L 262 du 17/10/2000 p. 0021 - 0045 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000879517&categorieLien=id>
77. Société Française d'Hygiène Hospitalière, SF2H. Guide pour le choix des désinfectants - Produits de désinfection chimique pour les dispositifs médicaux, les sols et les surfaces - Hygiènes - Volume XXII - N° 6 - Janvier 2015.
78. L'Institut national de recherche et de sécurité (INRS), Christine David et Isabelle Balty. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie. s. d., 40,; 2014.
79. Clark EM, Wright H, Lennon K-A, Craik VA, Clark JR, March JB. Inactivation of Recombinant Bacteriophage Lambda by Use of Chemical Agents and UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(8):3033-6.
80. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H). Actualisation des précautions standard

- Etablissements de santé, Etablissements médicosociaux, Soins de ville. Volume XXV - N° Hors série; 2017.

81. Briers Y, Miroshnikov K, Chertkov O, Nekrasov A, Mesyanzhinov V, Volckaert G, et al. The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;374(4):747-51.

82. Code de la santé publique. Article L5123-2 relatif au prix et agrément des médicaments à usage humain. Version en vigueur au 25 décembre 2013. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689956&dateTexte=&categorieLien=cid>

83. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Guide des bonnes pratiques de fabrication. Mai 2019.

84. Commission européenne, 2001. Directive 2001/20/CE du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain [Internet]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_20/dir_2001_20_fr.pdf

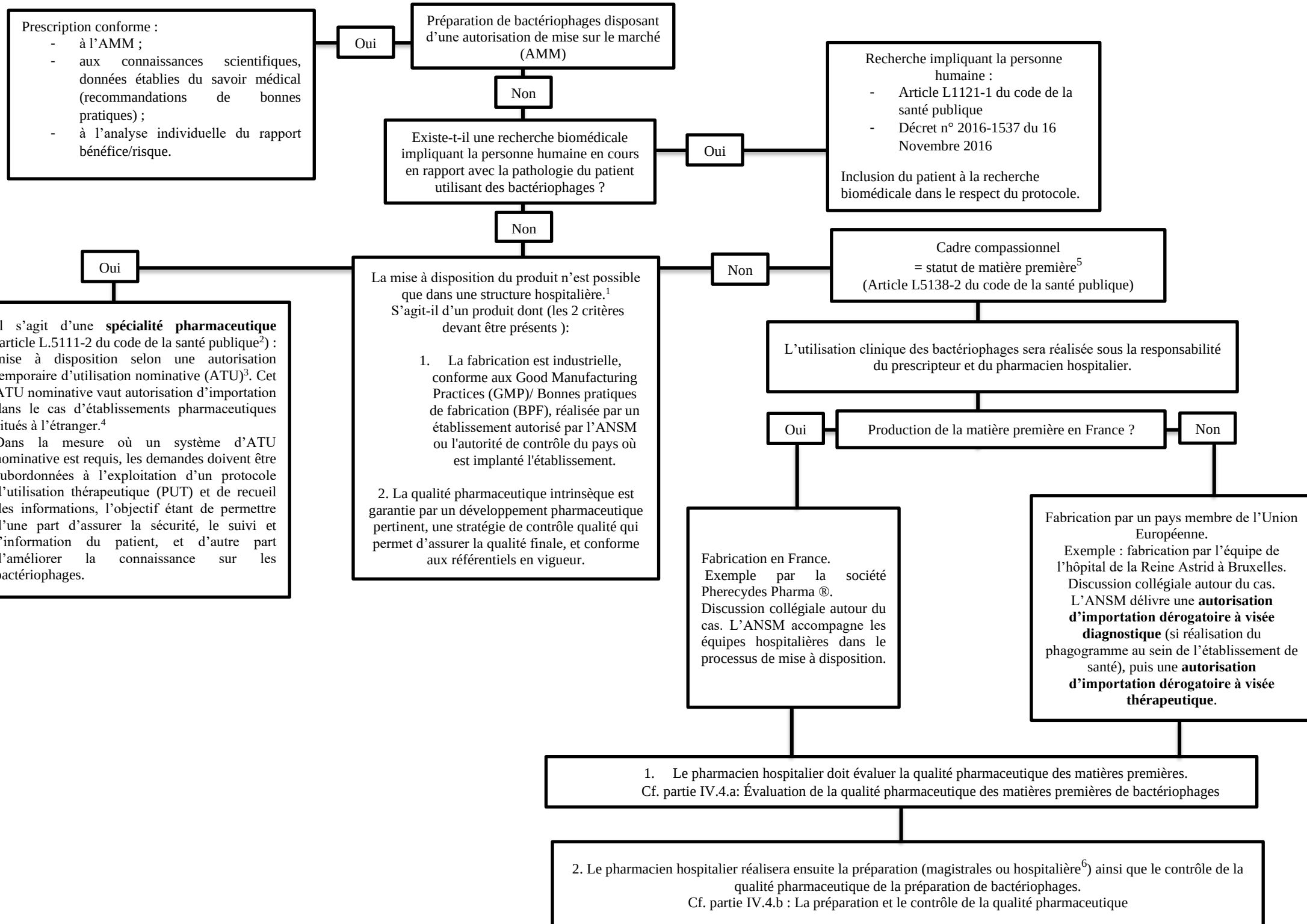
85. Code de la santé publique. Article L5126-5 relatif aux pharmacies à usage intérieur. Version en vigueur au 19 janvier 2018 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690078&dateTexte=&categorieLien=cid>

86. Code de la santé publique. Article L.5121-1 relatif aux médicaments à usage humain. Version en vigueur au 1er juillet 2017. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000026499732&cidTexte=LEGITEXT000006072665>

87. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*. 2013;443(2):187-96.

ANNEXE 1

Algorithme de mise à disposition des bactériophages selon le statut de la préparation



¹ Les suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une pharmacie à usage intérieur d'un établissement hospitalier, ceci nécessite donc un suivi dans un service hospitalier.

² Article L5111-2 du code de la santé publique : « On entend par spécialité pharmaceutique, tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale. »

³ Concernant les ATU dites nominatives, l'ANSM peut autoriser l'utilisation, à titre exceptionnel, de certains médicaments destinés à traiter, prévenir ou diagnostiquer des maladies graves ou rares, lorsqu'il n'existe pas de traitement approprié, et que leur efficacité et leur sécurité d'emploi sont présumées en l'état des connaissances scientifiques. Ce type d'accès aux médicaments s'adresse à un seul patient nommément désigné ne pouvant participer à une recherche biomédicale, concerne des médicaments dont le rapport efficacité/sécurité est présumé favorable pour ces patients au vu des données disponibles, et est délivré à la demande et sous la responsabilité du médecin prescripteur dès lors que le médicament est susceptible de présenter un bénéfice pour ce patient.

⁴ Conformément aux articles L.5124-13 et R.5121-108 du code de la santé publique, l'ATU nominative (ATUn) et l'ATU de cohorte (ATUc) valent autorisation d'importation. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de solliciter auprès de l'ANSM, une autorisation d'importation pour les médicaments bénéficiant d'une ATUn ou d'une ATUc. Cependant, l'importation d'un médicament en ATU nominative à des fins de constitution de stocks par un établissement pharmaceutique ou par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé nécessite l'obtention préalable d'une autorisation spécifique délivrée par le directeur général de l'ANSM.

⁵ L'article L.5138-2 donne la définition suivante : "On entend par matières premières à usage pharmaceutique tous les composants des médicaments au sens de l'article L.5111-1, c'est-à-dire :

- la ou les substances actives ;
- le ou les excipients ;
- les éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés chez l'homme ou chez l'animal ou à leur être administrés."

Dans le cadre de la transposition en droit interne de la directive 2011/62/UE du 8 juin 2011 qui vise à la lutte contre la falsification de médicaments, l'article L. 5138-1 du code de la santé publique modifié par l'ordonnance n° 2012-1427 du 19 décembre 2012 prévoit :

- un régime d'autorisation pour les établissements exerçant des activités de fabrication, d'importation et de distribution de substances actives
- un régime déclaratif pour les établissements exerçant ces mêmes activités pour les excipients

Le décret d'application de cette ordonnance fixe les modalités des demandes d'autorisation et de déclaration de ces activités (décret n° 2012-1562 du 31 décembre 2012). La décision du directeur général de l'ANSM du 24 février 2015 fixe la forme et le contenu de la demande d'autorisation et de déclaration de ces activités. Elle abroge la décision DG n° 2013-104 du 21 mars 2013 et modifie les modalités de mise à jour des télé-enregistrements.

Les renseignements administratifs et techniques doivent être soumis à l'ANSM via un portail de télé-enregistrement.

Les modifications "annuelles" doivent être dorénavant communiquées dans un délai de 12 mois à partir de la date du précédent télé-enregistrement.

Doivent être notifiées sans délai :

- toute modification des renseignements administratifs
- toute modification susceptible d'avoir une incidence sur la qualité ou la sécurité des matières premières à usage pharmaceutique
- toute cessation d'activité

[http://ansm.sante.fr/Activites/Matieres-premieres-a-usage-pharmaceutique-MPUP/Autorisation-et-declaration-des-activites-de-fabrication-d-importation-et-de-distribution/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Matieres-premieres-a-usage-pharmaceutique-MPUP/Autorisation-et-declaration-des-activites-de-fabrication-d-importation-et-de-distribution/(offset)/0)

⁶Article L5121-1 (Modifié par ordonnance n°2016-1729 du 15 décembre 2016 - art. 2) : « On entend par :

1° Préparation magistrale, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-6 ;

2° Préparation hospitalière, tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-6. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé ;

3° Préparation officinale, tout médicament préparé en pharmacie, inscrit à la pharmacopée ou au formulaire national et destiné à être dispensé directement aux patients approvisionnés par cette pharmacie [...] »

ANNEXE 2

Essais cliniques utilisant des bactériophages

1. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION CUTANEE

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

Titre de l'étude	Essai clinique de phase I/II, randomisé (1:1), multicentrique, européen, contrôlé <i>versus</i> comparatif actif (standard of care), dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et la tolérance d'un cocktail de bactériophages dans le traitement d'infections cutanées à <i>P. aeruginosa</i> chez des patients brûlés. Initialement l'essai testait également un cocktail de bactériophages actifs sur <i>E. coli</i> . Mais en janvier 2016, compte tenu du faible niveau de recrutement des patients présentant une infection cutanée à <i>E. coli</i> (n=1), il a été décidé d'arrêter l'évaluation clinique des bactériophages anti- <i>E. coli</i>
Statut de l'essai clinique	Terminé Début : 22 Juillet 2015 → Fin : 2 Janvier 2017 en raison d'une efficacité insuffisante du traitement PP1131.
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus, hospitalisés dans un centre de traitement des brûlés et présentant : - une brûlure cutanée infectée à <i>P. aeruginosa</i> , confirmée par des prélèvements microbiologiques ; Initialement, pour être inclus le patient devrait présenter une infection monobactérienne à <i>P. aeruginosa</i> . Cependant, suite à un amendement, une colonisation mineure par d'autres germes était acceptée. - un ou plusieurs signes cliniques d'infection selon les critères définis par la Société Française d'Étude et de Traitement des Brûlures. Suite à l'amendement, tout patient présentant une augmentation du Score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) de 2 points ou plus dans les 48 heures précédant l'inclusion, était exclu.
Critère de jugement principal	Temps nécessaire pour obtenir une réduction durable de la charge bactérienne de deux quadrants ou plus selon la méthode d'ensemencement à quatre quadrants (méthode semi-quantitative), analyse statistique multivariée avec ajustement selon la prise ou non d'antibiotiques actifs sur <i>P. aeruginosa</i> entre J0 et J7. Des prélèvements microbiologiques quotidiens ont été réalisés.
Autres critères de jugement	La tolérance au traitement a été évaluée chez tous les patients ayant reçu au moins une dose du traitement (suspension de bactériophages PP1131/crème de sulfadiazine). Une étude ancillaire (sensibilité de la souche bactérienne isolée chez les patients vis-à-vis des bactériophages à J7, stabilité de la suspension de bactériophages) a été menée afin de déterminer les raisons des succès ou des échecs du traitement PP1131.
Traitements expérimentaux	- Traitement standard : crème de sulfadiazine argentique 1% ; - Suspension PP1131 de 12 bactériophages lytiques anti - <i>P. aeruginosa</i> (1 ^{ère} préparation de bactériophages dont la fabrication était conforme aux BPF).
Design de l'étude	L'étude comporte 2 bras : - Bras contrôle : crème de sulfadiazine argentique 1% ; application en topique local de la crème sans support vecteur, directement sur la peau ; - Bras traitement : suspension liquide PP1131 de 12 bactériophages lytiques anti- <i>P. aeruginosa</i> ; imprégnation d'un EOP neutre par la suspension PP1131, suivi de l'application en topique local de ce support « vecteur de bactériophages » sur la plaie à traiter ; support neutre : pansement Algostéril®

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite	Durée et fréquence d'administration du traitement : 1 application par jour pendant 7 jours. Période de suivi : 14 jours Durée totale de l'étude : 21 jours. La co-prescription d'antibiotiques était autorisée au cours des 7 jours de traitement de l'étude, à la discrétion du clinicien. Le clinicien n'était pas en aveugle en raison des formes galéniques différentes des 2 traitements de l'étude. Les microbiologistes et les patients étaient en aveugle.
Résultats	Nombre de patients inclus au total : 27 Nombre de patients pour l'évaluation de l'efficacité du traitement = 25 (N = 12 traitements PP1131, N = 13 dans le bras contrôle) Nombre de patients pour l'évaluation de la tolérance au traitement = 26 (N = 13 traitements PP1131, N = 13 dans le bras contrôle) Résultats pour le critère de jugement principal (analyse réalisée en intention de traité modifiée) ; Différence du temps médian pour obtenir une diminution de deux quadrants ou plus. La prise ou non d'antibiotiques actifs sur <i>P. aeruginosa</i> peut être un biais de confusion, il s'agit d'un facteur accessoire par rapport au critère de jugement principal qui peut masquer ou causer des différences. Le modèle de régression de Cox a donc été appliqué ici afin de prendre en compte ce facteur de confusion. Ainsi des analyses multivariées ont été réalisées afin de rééquilibrer les 2 groupes par ajustement statistiques selon la prise ou non d'antibiotiques actifs <i>P. aeruginosa</i> entre J0 et J7. - Délai médian dans le bras traitement par bactériophages = 144 heures (95% CI 48– not reached) ; - Délai médian dans le bras contrôle = 47 heures (23 – 122 ; hazard ratio [HR] 0,29 [95% CI 0,10–0,79]). Délai médian significativement supérieur dans le bras traitement par bactériophages par rapport au bras contrôle (p = 0,018). La co-administration d'antibiotiques (initié à J0 ou au cours de la période de traitement de l'étude) actifs sur <i>P. aeruginosa</i> ne modifie pas l'efficacité des traitements (traitement standard ou traitement par bactériophages). Évaluation de la tolérance aux traitement administrés (analyse en per protocole) : 3 patients sur 13 ont présenté des effets indésirables dans le bras « traitement par bactériophages » versus 7 sur 13 dans le bras « traitement standard » → Différence non significative.
Limites de l'étude	- Faible nombre de patients inclus (critères d'inclusions trop restrictifs et problèmes de production) : puissance statistique faible. Initialement dimensionnée pour une centaine de patients par bras traitement, l'étude a finalement abouti au recrutement de 27 patients dont 25 ont fourni des données exploitables. Ce faible niveau d'inclusion a transformé PhagoBurn en une étude de preuve de concept clinique. - Groupe non comparable sur les critères « âge », « sévérité des brûlures », « charge bactérienne initiale » : les patients traités avec la suspension PP1131 étaient plus âgés et plus sévèrement brûlés. Or, l'âge et la sévérité des brûlures sont 2 facteurs de risque de sévérité des brûlures. La charge bactérienne initiale était plus élevée chez les patients traités avec la suspension P1131. En comparant les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes des patients des 2 bras, il a été montré que les souches bactériennes des patients du bras contrôle étaient sensibles, à J0, à un plus grand nombre d'antibiotiques.

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite

- Le succès du traitement par bactériophages dépend de la sensibilité de la souche bactérienne aux bactériophages testés : or, dans cet essai, le phagogramme n'était pas réalisé avant la mise sous traitement. Une étude ancillaire, menée chez les patients pour lesquels un échec au traitement par bactériophages a été observé (analyse per-protocole), a révélé que les bactéries isolées étaient majoritairement résistantes aux doses de bactériophage administrées.
Dans le bras traitement par bactériophages : parmi les patients pour lesquels il n'a pas été observé une réduction de la charge bactérienne de 2 quadrants ou plus, un phagogramme a été réalisé *a posteriori* (n = 5 patients) : 24% des souches bactériennes étaient sensibles au cocktail de bactériophages PP1131, 60% étaient de sensibilité intermédiaire et 16% étaient résistantes.
Dans le bras traitement par bactériophages : un phagogramme a été réalisé *a posteriori* avec les souches bactériennes des patients pour lesquels il a été observé une réduction de la charge bactérienne de 2 quadrants ou plus (n = 5 patients) : 89% des souches bactériennes étaient sensibles au cocktail de bactériophages PP1131, 11% étaient de sensibilité intermédiaire et aucune n'étaient résistantes. Aucune information n'a été donnée sur le type de résistance et leurs mécanismes moléculaires.
- Des études de stabilité ont révélé une décroissance du titre de la suspension à 1×10^5 PFU/mL- 1×10^4 PFU/mL (titre initial de 1×10^9 PFU/mL). Or, des dilutions étaient nécessaires afin de réduire la concentration en endotoxines, ainsi le titre de la suspension de bactériophages appliquée quotidiennement était seulement d'environ 1×10^2 PFU/mL. Selon les données de la littérature et les études précliniques, il avait été décidé d'utiliser une multiplicity of infection (rapport du nombre de bactériophages sur le nombre de bactéries, MOI) de 10. Or étant donné que le titre de la suspension était inférieur à celui initialement prévu et que la charge bactérienne était très élevée, la MOI au niveau du site infecté était plus faible. Ceci a pour principales conséquences :
 - l'amplification virale au niveau du foyer infectieux est plus lente;
 - une lyse bactérienne plus lente → décroissance plus lente de la charge bactérienne.
 Le nettoyage quotidien de la plaie a probablement eu un effet négatif sur l'activité des bactériophages.
- Différence dans l'application des 2 traitements : application directe du traitement standard *versus* utilisation d'un support vecteur pour le traitement par bactériophages
- Des études précliniques ont démontré *in vitro* que, pour des suspensions de bactériophages dont le titre était de 10^9 PFU/mL l'utilisation d'un support n'avait aucun impact sur la libération des bactériophages, aucun effet de « trapping » n'avait été observé. Or, cet effet ne peut être exclu pour une suspension dont le titre est plus faible.
- L'étude a été stoppée entre le 02/01/2016 et le 31/05/2016 suite à des amendements au protocole et à des problèmes de stabilité. Certains critères d'inclusions ont été modifiés : initialement la brûlure devait être infectée uniquement par *P. aeruginosa*. L'analyse des données épidémiologiques issues des centres, a abouti à une surestimation du nombre d'infections cutanées monobactériennes à *P. aeruginosa*. Dans les dossiers médicaux, les centres ne faisaient pas les distinctions entre les infections monobactériennes et les infections polymicrobiennes. Suite à l'amendement, une colonisation mineure par d'autres germes était acceptée.
- Le manque de stabilité de PP1131 au cours du temps a obligé les coordinateurs à interrompre l'étude de janvier à mai 2016, concourant ainsi à réduire la durée de l'étude clinique à un total de 13 mois.
- L'absence d'effet indésirable grave peut être expliqué par le faible titre de la préparation.

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite
Conclusions

Il s'agit d'un essai exploratoire. L'étude est négative sur le critère de jugement principal et présente de nombreuses limites.
Le profil de tolérance de la suspension de bactériophages anti - *P. aeruginosa* PP1131 était acceptable mais probablement biaisé en raison du faible titre de la préparation.

2. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION ORL CHRONIQUE

Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique (11)

Titre de l'étude	Essais clinique visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des bactériophages dans les otites chroniques à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistant : Essai clinique phase I/II prospectif, monocentrique, en double aveugle, randomisé, contrôlé <i>versus</i> placebo.
Statut de l'essai clinique	Terminé Lors de l'analyse intermédiaire, il a été décidé d'arrêter l'étude précocement, à l'inclusion 24 ^{ième} patients. En effet, les données d'efficacité disponibles étaient suffisantes pour conduire une étude pilote de phase III.
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus présentant une otite chronique à <i>P.aeruginosa</i> multirésistant. Une étude de la sensibilité de la souche bactérienne <i>P.aeruginosa</i> isolée aux bactériophages étaient réalisée avant l'inclusion. La souche bactérienne isolée devait être sensible au minimum à un des six bactériophages contenus dans le cocktail.
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal était clinique : évaluation des lésions par le médecin avec un score composite et évaluation par le patient de ses symptômes avec un autre score. Les paramètres suivants étaient évalués par les médecins via une échelle visuelle : érythème/inflammation, ulcération/granulation/polypes, écoulement de type purulent/muqueux/ muco-purulent, quantité évacuée, odeur. Les paramètres suivants étaient évalués par les patients via une échelle visuelle : inconfort, démangeaison, écoulement, odeur.
Autres critères de jugement	Le critère de jugement secondaire était le compte bactérien et le titre des bactériophages. Un dénombrement des bactéries ainsi que des bactériophages présents dans la cavité auriculaire a été réalisé à J0, J7, J21 et J42. La tolérance au traitement a été évaluée à chaque visite à l'aide d'un questionnaire patient.
Traitements expérimentaux	- Placebo, composition : mélange de glycérol et PBS ; - Une suspension contenant 6 bactériophages lytiques anti - <i>P. aeruginosa</i> , le titre de la suspension était 1×10^5 PFU/mL (Biophages PA®).
Design de l'étude	2 bras : - Bras contrôle : placebo ; - Bras traitement : cocktail de phages anti - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Les patients reçoivent une dose locale unique, dans une oreille, de 200 µL d'un cocktail de bactériophages anti - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou du placebo en intra-auriculaire à J0. Aucun traitement supplémentaire n'était autorisé (antibiotique ou autre traitement en systémique ou en topique local). Un lavage auriculaire était réalisé seulement à J7, J21 et J42. Un audiogramme ainsi qu'une otoscopie étaient réalisés à J0 et J42. Une surveillance des patients étaient réalisées à J0, pendant 6h après l'administration. Les patients étaient suivis à J7, J21 et J42 après l'administration du médicament expérimental.
Résultats	24 patients ont été inclus, 12 dans chaque bras. 86,2% de souches bactériennes étaient sensibles à au moins un des six bactériophages contenus dans les cocktails. Au sujet de l'évaluation des signes cliniques par le médecin : il a été observé une réduction significative de l'intensité des différents symptômes par rapport au niveau de base à l'inclusion chez les patients traités par le cocktail de bactériophages : érythème/inflammation ($p = 0,027$), ulcération/granulation/polypes

Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique (11)

suite	(p=0,040), écoulement de type purulent/muqueux/ muco-purulent (p = 0,043), odeur (p = 0,026). Aucune différence significative de l'intensité des symptômes n'a été observée chez les patients du groupe placebo. Au sujet de l'évaluation des signes cliniques par le patient, il a été observé une réduction significative de l'intensité des 3 symptômes par rapport au niveau de base à l'inclusion chez les patients traités par le cocktail de bactériophages : inconfort (p = 0,003), démangeaison (p = 0,001), écoulement (p = 0,001). Aucune différence significative de l'intensité des symptômes n'a été observée chez les patients du groupe placebo. Chez certains patients traités par bactériophages il a été observé une réduction de 80% de la symptomatologie initiale. La réduction moyenne était de 50%. Aucun patient dans le groupe placebo n'a présenté une telle amélioration des symptômes, la réduction moyenne étant de 20%. Une réduction significative du nombre de bactéries <i>P. aeruginosa</i> a été observée dans le groupe « traitement par bactériophages » (p < 0,0001), aucune différence significative n'a été observée dans le groupe placebo. Les bactériophages se sont multipliés au cours du traitement : dose initiale de bactériophages : 6×10^5 PFU/mL, quantité moyenne de bactériophages dans la cavité auriculaire au cours des visites de suivi = $1,27 \times 10^8$ PFU/mL. Aucun effet indésirable grave n'a été rapporté. Les effets indésirables rapportés ne sont pas imputables au traitement.
Limites de l'étude	- L'évaluation du critère principal est réalisée à l'aide d'une échelle visuelle analogique, ce type d'évaluation est subjective. Il peut exister un biais d'information non différentiel lié à la méthode de mesure du critère principal. - A propos des critères d'inclusion, il est indiqué dans le titre, que cette étude s'adresse à des patients souffrant d'otites chroniques à <i>P.aeruginosa</i> multirésistant. La définition de la maladie n'est pas basée sur un consensus de critères internationaux. Les critères d'inclusions peuvent donc sembler larges, non clairement définis. La population de l'étude peut donc présenter des signes cliniques hétérogènes, de gravités différentes : de la simple colonisation à l'otite. - Nombre de patients limité. - La numération de <i>P. aeruginosa</i>, réalisée au dernier jour de l'essai, a montré une faible diminution moyenne, de 9×10^9 à 2×10^9 UFC/g d'échantillon, l'effet est donc de faible amplitude. - Il a été observé pour certain patient une persistance de la souche bactérienne dans la cavité auriculaire (présence de bactéries confirmée lors du dénombrement). Pour ces patients, le schéma thérapeutique en une dose unique peut être discuté, une nouvelle administration pourrait être envisagée en fonction des résultats microbiologiques.
Conclusions	L'étude était positive sur le critère de jugement principal et le critère de jugement secondaire, cependant l'effet est de faible amplitude. La tolérance du cocktail de bactériophages anti-<i>P. aeruginosa</i> était acceptable.

3. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION URINAIRE

	Tableau V. Essai clinique dans l'infection urinaire (12)
Titre de l'étude	Essai clinique randomisé, en double aveugle, contrôlé <i>versus</i> placebo dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'une administration intra-vésicale de bactériophages dans le traitement des infections urinaires symptomatiques.
Statut de l'essai clinique	En cours, résultats non publiés, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03140085 Début de l'étude : Novembre 2015
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus, devant subir une résection transurétrale de la prostate par voie endoscopique, présentant une infection des voies urinaires symptomatique définie par : - un ECBU positif ; - une bactériurie $\geq 10^4$ UFC/mL, présence de bactéries uropathogènes : <i>E. coli</i>, <i>Proteus</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Enterococcus</i> ; - les bactéries doivent être sensibles au cocktail de bactériophages, un phagogramme est réalisé avant la randomisation.
Critère de jugement principal	Succès du traitement administré en intra-vésicale pendant 7 jours. Le traitement est considéré comme efficace s'il permet une normalisation des cultures bactériologiques urinaires : absence de bactérie ou bactériurie $< 10^4$ UFC/mL.
Autres critères de jugement	Critère secondaire : évaluation de la tolérance au traitement : suivi des effets indésirables. Critère tertiaire : suivi de l'évolution des symptômes d'HBP ¹ (résidus post-mictionnel, fuites urinaires, nombre de fois où la vessie se vide), évaluation de la douleur à l'aide d'une échelle visuelle analogique, comparaison des résultats du questionnaire « International Prostate Symptom Score » (IPSS) à J0 et à J7
Traitements expérimentaux	Placebo : solution stérile « Pyo bactériophage [®] » : cocktail de 5 bactériophages (<i>E coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp)
Design de l'étude	3 bras, randomisation (1:1:1), tous les patients subiront une résection transurétrale de la prostate par voie endoscopique, un cathéter sus-pubien sera posé : - bras « a » traitement par bactériophages : administration intra-vésicale d'un cocktail de bactériophages ; - bras « b » : contrôle : administration intra-vésicale d'un placebo ; - bras « c » traitement antibiotique : selon la sensibilité de la souche bactérienne en cause, début de l'administration : le jour de la chirurgie. Durée du traitement : 7 jours. Le placebo ou la suspension de bactériophages doivent rester au contact de la vessie pendant 30-60 min. Le cocktail de bactériophages ou le placebo seront administrés via le cathéter sus-pubien 2 fois par jour à compter du premier jour après la chirurgie. Un ECBU est réalisé avant l'inclusion afin de tester la sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques. Le traitement placebo et la suspension de bactériophages sont administrés en double aveugle. Le traitement antibiotique, quant à lui, est administré en ouvert. Si un patient inclus dans le bras « a » ou « b » présente de signes cliniques et biologiques (CRP > 100 mg/l, fièvre > 38 °C) d'infection systémique au cours de la période de traitement, alors un traitement antibiotique adapté sera introduit. Un traitement antibiotique sera également initié chez les patients présentant une infection urinaire persistante à l'issue des 7 jours de traitement.
Hypothèses	Supériorité de l'efficacité du traitement par bactériophages par rapport au placebo (Nombre de patients nécessaires = 81, puissance 80%) Non-infériorité de l'efficacité traitement par bactériophages par rapport au traitement antibiotique. (Nombre de patients nécessaires = 81, puissance 80%))

¹HBP : hypertrophie bénigne de la prostate

4. ESSAI CLINIQUE CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN

Tableau VI. Résultats de l'essai clinique utilisant des bactériophages chez des volontaires sains (8)

Titre de l'étude	Étude monocentrique, randomisée, en double aveugle, en cross-over, contrôlée <i>versus</i> placebo visant à évaluer la sécurité de l'administration de bactériophages par voie orale chez des volontaires sains.
Statut de l'essai clinique	Terminé. L'étude s'est déroulée en Juin 2003 et a duré 1 mois.
Population de l'étude	Volontaires sains adultes âgés de 23 à 54 ans travaillant chez Nestlé®
Objectif de cette étude	L'objectif de cette étude était d'évaluer la sécurité de l'administration orale de bactériophages. Un suivi des effets indésirables, des paramètres biologiques (ALAT/ASAT), de l'apparition d'anticorps anti-bactériophages T4 ainsi que du titre phagique et bactérien dans les selles a été réalisé tout au long de l'étude.
Traitements expérimentaux	le traitement A : suspension de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 = 10^5 PFU/ml ; le traitement B : suspension de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 = 10^3 PFU/ml ; le traitement C : placebo. } Le véhicule était de l'eau minérale.
Design de l'étude	Les sujets ont été randomisés selon les séquences : ABC, BCA et CAB. L'étude a été divisée en 4 périodes de 1 semaine. Semaine 1 : niveau de base, 2 prélèvements de selles ont été réalisés. Semaine 2, semaine 3 et semaine 4 : les sujets ont reçu selon la randomisation, 150 mL du traitement expérimental, par voie orale, 3 fois par jour pendant 2 jours, suivi de 5 jours sans traitement (période de wash-out). Au cours de ces 3 semaines, des prélèvements de selles ont été réalisés 1 fois par jour. Un examen clinique a été effectué par un médecin à J0 et J30. Les volontaires ont reçu des formulaires sur lesquels ils pouvaient signaler tout type d'événement indésirable.
Résultats	Volontaires sains : n=15. Les traitements ont été correctement tolérés, 5 effets indésirables mineurs ont été rapportés. Ils ne sont imputables aux traitements. Les taux sériques des transaminases sont restés conformes aux valeurs normales et aucun anticorps anti-bactériophage <i>E. coli</i> T4 n'a été observé dans le sérum des sujets à la fin de l'étude. A l'issue de la période de suivi aucun bactériophage T4 n'a été retrouvé dans le sérum des sujets. Le titre de bactériophage mesuré dans les selles varie de manière dose dépendante selon l'administration orale de bactériophages : dans le bras B les patients ont reçu une dose totale de bactériophages T4 de 9×10^7 PFU/mL, un titre similaire (10^7 PFU/mL) a été mesuré dans les selles. Ainsi il semble que la préparation de bactériophages reste stable au cours du transit dans le tractus gastro-intestinal. Aucune modification du titre bactérien mesuré dans les selles n'a été observée suite à l'administration orale de bactériophage.
Limites	- Faible nombre de patients n=15 - Il s'agit d'un essai exploratoire. - Il n'est pas possible d'exclure de manière certaine la destruction des bactériophages par le pH acide de l'estomac
Conclusions	Le traitement a été correctement toléré, aucun des volontaires sains n'a présenté d'effets indésirables imputables au traitement, ni d'élévation des marqueurs de cytolysé hépatique, ni même développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage testé. Il s'agit d'un essai exploratoire. Les données collectées lors de cette étude ont été utilisées pour déterminer le schéma de l'essai clinique réalisé chez des enfants (âgés de 6 à 24 mois) présentant une diarrhée aiguë, décrit ci-dessous.

5. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION DIGESTIVE

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

Titre de l'étude	Une étude randomisée, prospective, monocentrique, contrôlée <i>versus</i> placebo a été réalisée au Bangladesh chez des enfants (âgés de 6 à 24 mois) présentant une diarrhée aiguë depuis moins de 48h (soit d'apparition récente), avec déshydratation. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité et la sécurité du cocktail de bactériophages T4 par rapport au cocktail Microgen® (coli proteus phages) ou au placebo.
Statut de l'essai clinique	Terminé. Début : Juin 2009 ; fin : Septembre 2011 L'étude a été arrêtée lors de l'analyse intermédiaire des données (N=120).
Population de l'étude	Enfants âgés de 6 à 24 mois présentant : - une diarrhée aiguë d'apparition récente définie par au moins 4 selles/jour au cours des dernières 24h ; - des signes de déshydratations selon les critères définis par OMS. Des analyses microbiologiques et virologiques des selles étaient réalisées avant la randomisation afin de vérifier l'absence de Rotavirus ou de bactéries du genre <i>Vibrio</i> .
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal était la tolérance au traitement par bactériophages évaluée par : l'examen clinique de patients, le suivi des fonctions hépatiques et rénales et des paramètres hématologiques.
Autres critères de jugement	Le critère de jugement secondaire était le titre de bactériophages anti- <i>E. coli</i> et le dénombrement bactérien (<i>E. coli</i> totaux) dans les fèces, la sensibilité des souches <i>E. coli</i> aux bactériophages ainsi que la clairance des <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC) dans les selles. L'objectif <i>in fine</i> étant d'évaluer l'activité <i>in vivo</i> du bactériophage lytique. Enfin le critère d'évaluation tertiaire était l'impact de l'administration de bactériophages par voie orale sur différents paramètres, depuis la randomisation jusqu'à la guérison, tels que : - la quantité de selles produite en g/kg de masse corporelle par jour ; - la fréquence des selles en nombre par jour ; - la volume de soluté de réhydratation nécessaire pour corriger la déshydratation du patient en ml/kg de masse corporelle par jour. La résolution des diarrhées était définie par l'émission des selles moulées pendant 2 périodes consécutives de 6 heures. A noter que si la diarrhée persistait au-delà de 5 jours, le traitement était considéré comme inefficace, et le patient était transféré dans un autre hôpital pour une prise en charge selon le protocole standard.
Traitements expérimentaux	Placebo : NaCl 0,9% Le « T4 phage cocktail » : mélange de 11 bactériophages anti - <i>E. coli</i> T4, le titre de la suspension était $3,6 \times 10^8$ PFU/mL Cocktail Microgen® ColiProteus, le titre de la suspension était $1,4 \times 10^9$ PFU/mL, la composition est détaillée précisément dans une publication (87).
Design de l'étude	2 bras, randomisation par bloc de 6 (1:1:1) : - Bras contrôle : placebo (NaCl 0,9%) ; - Bras traitement : cocktail de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 ou le cocktail Microgen® ColiProteus.

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

suite	Les 3 traitements de l'étude ont été mélangés à une solution orale de réhydratation, de l'eau minérale et ont été administrés par voie orale à la posologie de 3 fois/jour pendant 4 jours. Période de suivi : une visite était réalisée 21 jours après la première dose de traitement.
Résultats	120 patients ont été inclus : 41 dans le groupe placebo, 40 dans le groupe Microgen[®], 39 dans le groupe bactériophages anti <i>E. coli</i> T4. L'analyse microbiologique des selles des 56 premiers patients a permis de confirmer que 77% présentaient dans leur selles l'agent pathogène <i>E. coli</i>. 1 patient présentait une diarrhée à rotavirus. Des germes tels que <i>Campylobacter jejuni</i> (n=9), <i>Campylobacter coli</i> (n=2), <i>Aeromonas</i> (n=2), <i>Vibrio cholerae</i> (n=2), <i>Salmonella</i> (n=1) et <i>Shigella flexneri</i> (n=1) ont été identifiés chez des patients. La présence de gènes de virulence de la souche <i>E. coli</i> a été recherchée dans les selles de ces 56 patients : des gènes spécifiques à ETEC¹ ont été détectés chez 28 patients ; des gènes spécifiques à EPEC² ont été détectés chez 5 patients, des gènes spécifiques à EAEC³ ont été détectés chez 7 patients. A l'admission les groupes étaient comparables sur les paramètres suivants : durée de la diarrhée, fréquence des selles et des vomissements. Les enfants dont l'analyse microbiologique des selles a permis d'identifier : - des bactéries pathogènes entériques autres que <i>E. Coli</i> ; - aucun agent pathogène ; sont restés dans l'étude et leurs données ont été utilisées pour l'analyse en intention de traiter (ITT). Une analyse en sous-groupe a été réalisée avec les données des patients présentant une infection confirmée à <i>E. coli</i>. <u>Critère de jugement principal (analyse per-protocole)</u> : Aucune différence significative n'a été observée entre les paramètres cliniques et hématologiques mesurés à l'admission et ceux mesurés à l'issue des 4 jours de traitement par bactériophages ou placebo (tests t appariés). Aucune altération de la fonction rénale et hépatique n'a été observée. <u>Critère de jugement secondaire</u> : Le titre et la prévalence des bactériophages anti-<i>E. coli</i> mesurés dans les selles étaient significativement supérieurs chez les patients traités par bactériophages par rapport au groupe placebo. Dans le groupe traitement par bactériophages, aucun patient n'a présenté dans les selles un titre phagique supérieur à celui des différentes préparations de bactériophages administrés. Dans le groupe traitement par bactériophages, il n'a pas été rapporté de différence significative dans le titre phagique mesuré dans les selles selon la sensibilité des souches <i>E. coli</i> aux bactériophages. Ces deux résultats suggèrent un transit passif des bactériophages dans l'intestin, aucune répllication virale significative ne semble avoir eu lieu <i>in vivo</i>. Seul 50% des patients présentaient dans leurs selles, une souche <i>E. coli</i> sensible aux bactériophages administrés lors de l'étude. Le nombre total de bactéries fécales était significativement plus faible chez les patients traités par bactériophages <i>versus</i> les patients traités par placebo (p < 0,001 test de Dumm). Chez les patients présentant une diarrhée à <i>E. coli</i>, cette souche représentait moins de 5% des bactéries fécales totales. Cependant la proportion de <i>E. coli</i> dans les selles était 10 fois plus élevée chez les patients présentant une diarrhée à <i>E.coli</i> comparé à ceux présentant une diarrhée due à un autre germe. Aucune diminution significative des titres ETEC¹ n'a été observée chez les patients traités par bactériophage <i>versus</i> ceux traités par placebo. <u>Critère de jugement tertiaire</u> : Lors de l'analyse intermédiaire, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes lors de la comparaison des paramètres suivants : quantité de selles produite, fréquence des selles, volume de soluté de réhydratation nécessaire pour corriger la déshydratation (P > 0.1 for all comparaisons, t test). Au jour 6, 93%, 88%, 84% des patients traités respectivement par Cocktail T4, Cocktail Microgen[®] et le placebo présentaient une résolution des diarrhées : aucune différence n'a été observée à propos du taux de résolution des diarrhées entre les différents groupes.

ETEC¹ : *E. coli* entérotoxigéniques
EPEC² : *E. coli* entéro-pathogènes
EAEC³ : *E. coli* entéro-aggrégatives

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

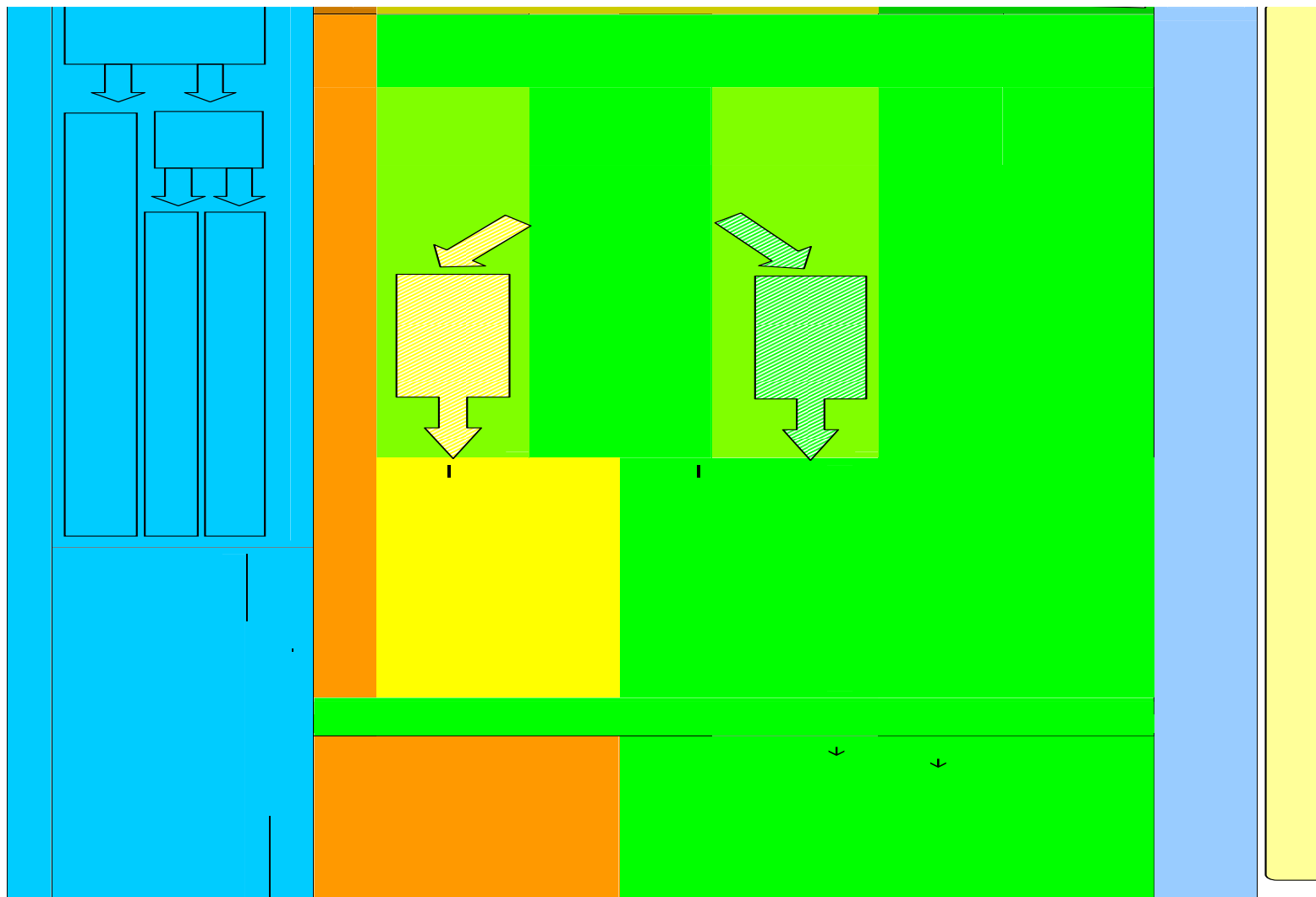
suite	L'analyse du microbiote intestinal (ARN 16S) ne montrait pas de perturbation significative des différentes populations bactériennes par rapport aux sujets ayant reçu le placebo.
Limites	- Le profil de tolérance des préparations orales de bactériophages est acceptable. Or lors de diarrhée, l'atteinte de l'intégrité de la muqueuse intestinale peut être à l'origine du passage des endotoxines et des entérotoxines, libérées lors de la lyse bactérienne par les bactériophages, dans la circulation générale. Cette libération massive de toxines peut être à l'origine de sepsis sévère ou autres réactions systémiques graves. Cependant, au cours de la phase de traitement, la faible réplication virale des bactériophages n'a pas permis de lyse bactérienne significative. Ainsi dans ce contexte, il semble difficile de conclure de manière certaine que l'administration per os de bactériophages est réellement dénuée d'effet indésirable. - Les 2 préparations de bactériophages administrées n'ont pas permis une résolution des troubles diarrhéiques. Il convient de rappeler que le critère de jugement principal était la tolérance au traitement, ainsi cet essai n'avait pas été conçu et n'avait pas la puissance statistique nécessaire pour permettre de conclure in fine à une quelconque efficacité du traitement. De plus lors de l'analyse intermédiaire, le nombre de patients inclus était seulement de 120, or il avait été prévu d'inclure 225 patients. - Seulement 60% des patients inclus présentaient dans leur selle une souche <i>E. coli</i> entéropathogènes. Ainsi les auteurs avaient surestimé le nombre de cas de diarrhées infantiles à <i>E. coli</i>. De plus chez les patients présentant une diarrhée à <i>E. coli</i>, cette souche représentait moins de 5% des bactéries fécales totales. Le titre bactérien moyen retrouvé dans les selles était de 10^5 UFC/g de selles, le titre phagique dans les selles était en moyenne de 10^6 PFU/g. Les auteurs avaient estimé que la quantité (« burst size ») moyenne de bactériophage produits à l'identique serait <i>in vivo</i> de l'ordre de 10. Ainsi dans ce contexte, le phénomène d'amplification virale ne pouvait avoir lieu. - Seul 50% des patients présentaient dans leurs selles, une souche <i>E. coli</i> sensible aux bactériophages administrés lors de l'étude. Le cocktail Microgen® dont la composition a été définie selon les données épidémiologiques et phénotypiques russes, ne permettait une couverture optimale des souches bactériennes responsables des diarrhées chez les enfants du Bangladesh. Il en est de même pour le cocktail T4 bactériophages dont la composition avait été définie quelques années auparavant. La conception d'un cocktail est idéalement basée sur des données épidémiologiques (quelles sont les bactéries les plus fréquemment isolées chez les enfants atteints de diarrhées au Bangladesh ?) et sur des données phénotypiques. Il doit être constitué de façon à obtenir la couverture la plus large possible vis-à-vis des souches statistiquement les plus représentées dans un type d'infection donné. Or dans le cas de cet essai, ce n'était pas le cas. - Les 2 préparations de bactériophages ont été administrées sans antiacide. Or l'alcalinisation de l'estomac est un prérequis indispensable à l'administration per os des bactériophages (20). Cependant, il n'était pas possible pour des raisons éthiques d'administrer les bactériophages avec des antiacides, en effet ces derniers augmentent les risques de survenue d'infections nosocomiales. A noter que les enfants ont un pH plus élevé que celui des adultes. Ainsi dans ce contexte, la formulation des préparations de bactériophages a probablement limité l'efficacité du traitement. - Les observations dans les matières fécales reflètent-elles réellement ce qu'il se passe dans l'intestin ? Les infections à <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène et <i>Escherichia coli</i> entéropathogène ont lieu dans les parties supérieures de l'intestin, ainsi des différences qualitatives et quantitatives peuvent exister entre ce qui se passe dans l'intestin et ce qui est mesuré dans les selles. Cependant, un tel échantillonnage est invasif et difficile à justifier d'un point de vue éthique, dans le cas d'une maladie normalement spontanément résolutive chez l'enfant.

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

suite	- Plusieurs éléments ont pu limiter les interactions <i>in vivo</i> des bactériophages et des bactéries et pourraient expliquer l'absence de réplication virale : l'augmentation du péristaltisme lors de la diarrhée, la réduction de la diffusion des bactériophages dans la muqueuse intestinale en raison de l'altération de cette dernière...
Conclusions	Aucun évènement indésirable attribuable au traitement par bactériophages n'a été observé. Le phénomène d'amplification virale au niveau du site infectieux n'a pas été observé. L'étude était négative sur le critère de jugement tertiaire. Les résultats précédemment cités peuvent être expliqués : - le spectre global de couverture des cocktails de bactériophages ne permettait pas de couvrir l'ensemble des souches bactériennes responsables de la pathologie préoccupante ; - par une densité bactérienne trop faible pour permettre un amorçage de la multiplication virale. Les auteurs ont souligné qu'il était fondamental de connaître la densité bactérienne au niveau du site infectieux afin de s'assurer que celle-ci est suffisante pour permettre un amorçage de la réplication virale <i>in vivo</i>. Ils ont également indiqué qu'il serait préférable d'administrer des doses de bactériophages plus élevées. Enfin ils ont conclu que des connaissances supplémentaires sur les interactions <i>in vivo</i> entre bactériophages et bactéries étaient nécessaires.

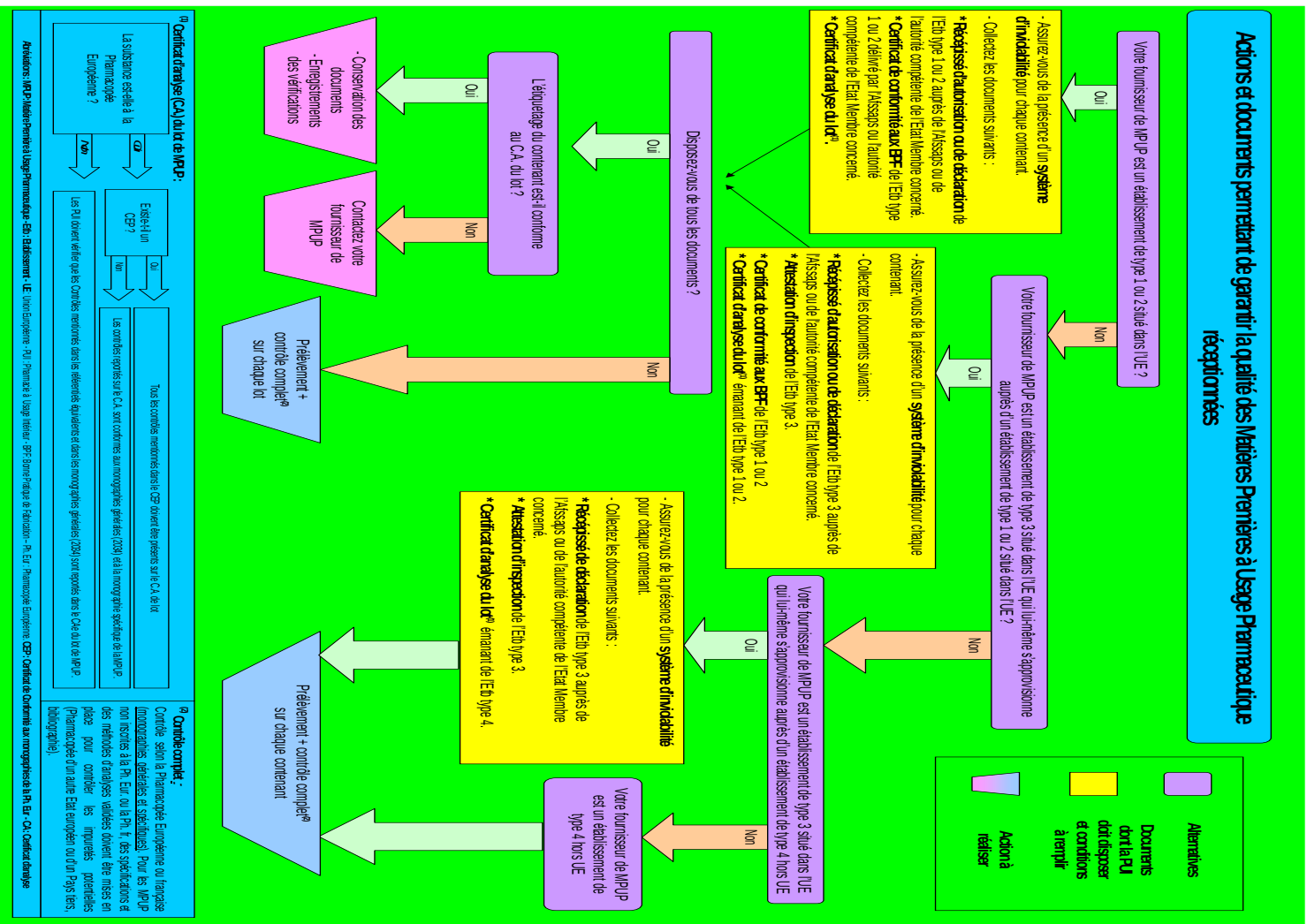
ANNEXE 3

Modalités de contrôle des Matières Premières à Usage Pharmaceutique selon leur circuit d'approvisionnement



ANNEXE 4

Actions et documents permettant de garantir la qualité des Matières Premières à Usage Pharmaceutique



ANNEXE 5

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Les données sont issues de la 9^{ème} édition de la Pharmacopée européenne. Elles ne sont pas spécifiques aux préparations de bactériophages. Elles sont applicables à tous les principes actifs (origine chimiques et biologiques).

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d’administration											
Voie d’administration		Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Critère d’acceptation de la qualité microbiologique des préparations non stériles Selon le Chapitre générale 5.1.4 de la Pharmacopée européenne	DGAT ¹ = 10 ² DMLT ² = 10 ¹	NC	✕ Si atteinte mineure de la peau	✕	NC	✕	✕		Les préparations présentées en récipients multidoses peuvent contenir un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, à moins que la préparation elle-même ne possède des propriétés antimicrobiennes adéquates.	✕	NC
	DGAT ¹ = 10 ³ DMLT ² = 10 ²						✕				
	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL)		✕ Si atteinte mineure de la peau	✕		✕	✕				
	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL)		✕ Si atteinte mineure de la peau	✕		✕	✕				
	Absence d’ <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)									✕	
	Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires (1 g ou 1 mL)					✕					

¹DGAT en UFC/g ou UFC/mL = Dénombrement des germes aérobies totaux

²DMLT en UFC/g ou UFC/mL = Dénombrement des moisissures/levures totales

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Voie d'administration	Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Suite Exigence de stérilité selon : - la Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne - le Chapitre générale 5.1.1 de la Pharmacopée européenne	×	× Si application sur une peau gravement atteinte.	NC	×	× Solution pour lavage nasale appliquée sur une partie lésée ou avant une intervention chirurgicale.	× Si application sur une oreille lésée (perforation du tympan) ou avant une intervention chirurgicale.	NC	× Sont concernées les préparations présentées en récipients : - multidoses ne contenant pas de conservateur antimicrobien et ne possédant pas des propriétés antimicrobiennes adéquates ; - en récipients unidoses et ne contenant pas de conservateur antimicrobien.	NC	×
Exigences relative à la concentration en endotoxines et critères d'acceptabilité Monographie 2.6.14 de la Pharmacopée européenne	[concentration en endotoxines] < à 5 UI ³ /kg (poids corporel du patient)/h (si perfusion > 1 heure).	NC	NC	[concentration en endotoxines] < à 0.5 UI ³ /mL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Les préparations auxquelles aucune méthode validée de détection des endotoxines bactériennes ne peut être appliquée satisfont à l'essai des pyrogènes. Monographie 2.6.8 de la Pharmacopée européenne	×	NC	NC	×	NC	NC	NC	NC	NC	NC

³UI = Unité internationale

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Voie d'administration	Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Suite Autres exigences spécifiques en lien avec la voie d'administration	Les solutions devront : - satisfaire à l'essai de contamination particulière : particules non visibles (Monographie 2.9.19 de la Pharmacopée européenne) ; - être limpides ; - pratiquement exemptes de particules.	NC	NC	NC	NC	Les préparations auriculaires destinées à être appliquées sur une oreille lésée, (perforation du tympan,) ou avant une intervention chirurgicale, sont stériles et, sauf exception justifiée et autorisée, exemptes de conservateurs antimicrobiens, et conditionnées en récipients unidoses.	NC	Si récipients multidoses, sans conservateur antimicrobien et si la préparation ne possède pas des propriétés antimicrobiennes adéquates : conditionnement dans des récipients empêchant la contamination microbienne du contenu au cours de la conservation et de l'utilisation.	NC	Les préparations devront être : - pratiquement limpide - pratiquement exemptes de particules Un essai visant à évaluer la taille des particules doit être réalisé (mode opératoire chapitre 7 de la Pharmacopée européenne).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Groupe de risque : du plus faible (1) au plus important (4).....	19
Tableau II. Précautions d'habillage lors de la réalisation de préparations stériles	41
Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn.....	62
Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique.....	66
Tableau V. Essai clinique dans l'infection urinaire	68
Tableau VI. Résultats de l'essai clinique utilisant des bactériophages chez des volontaires sains	69
Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du bactériophage T4	9
Figure 2. Les principaux cycles infectieux des bactériophages	10
Figure 3. Aspect de la technique des « sur-spots »	26
Figure 4. Exemple de titration de 2 solutions de bactériophage 536-P1 et 536-P7	27
Figure 5. Cinétique de lyse d'une souche X par les bactériophages A, B et C.....	28
Figure 6. Estimation des activités biocides des principales substances	42

LISTE DES ÉLÉMENTS SOUS DROITS

Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse
faute d'en détenir les droits

Document à intégrer dans la version partielle de la thèse

Illustrations, figures, images...

Légende de l'image	N° de l'image	Page(s) dans la thèse
Figure 1 : Dates de mise sur le marché de différents antibiotiques (en haut en bleu) et date de mise en évidence de résistance aux antibiotiques (en bas en rouge). D'après (4)	1	13
Figure 2 : Nombre d'antibiotiques mis sur le marché après approbation de la FDA (U.S. Food and Drug Administration) . D'après (4)	2	14
Figure 3 : Virus à ADN double brin de procaryotes et archées mettant en évidence l'absence de correspondance entre phylogénie et morphologie. Dendogramme généré par GRAVITY utilisant iTOL (12)	3	18
Figure 4 : Cycles lytique et lysogénique que peuvent adopter les bactériophages tempérés. Alors que le cycle lysogénique permet à la bactérie de survivre, le cycle lytique conduit à la lyse bactérienne et au relargage de plusieurs nouveaux virions. De (13)	4	19
Figure 12 : Schéma des systèmes bactériens de défense antivirale. De (53)	12	33

Figure 14 : Tableau de Yerushalmy et al., colligeant les acteurs institutionnels qui disposent de bactériophages disponibles à l'achat (69).	14	38
Figure 16 : Proposition de guide de BPF pour les bactériophages, par l'équipe de l'Hôpital de la Reine Astrid (75)	16	53
Figure 1: Representative morphologies of different phage families. <i>Caudovirales</i> , which include Myoviridae, Siphoviridae and Podoviridae families (on the left) are the longest and largest phage particles. From (Hyman and Abedon 2012)	1 (revue)	63
Figure 2: Half-life of nanoparticles in animal models according to their diameter. From (Hoshyar et al. 2016).	2 (revue)	65
Figure 18 : Mutations de surface de bactéries (bacilles Gram négatif en A, cocci Gram positif en B) avec acquisition de résistances aux bactériophages. En parallèle réduction du fitness et de la virulence des souches. De Mangalea et al. (80)	18	143
Figure 19 : Incidence des infections bactériennes au cours de la vie de patients atteints de mucoviscidose (d'après Cystic Fibrosis Foundation)	19	144

Articles, chapitres, entretiens cliniques...

[illegible]