

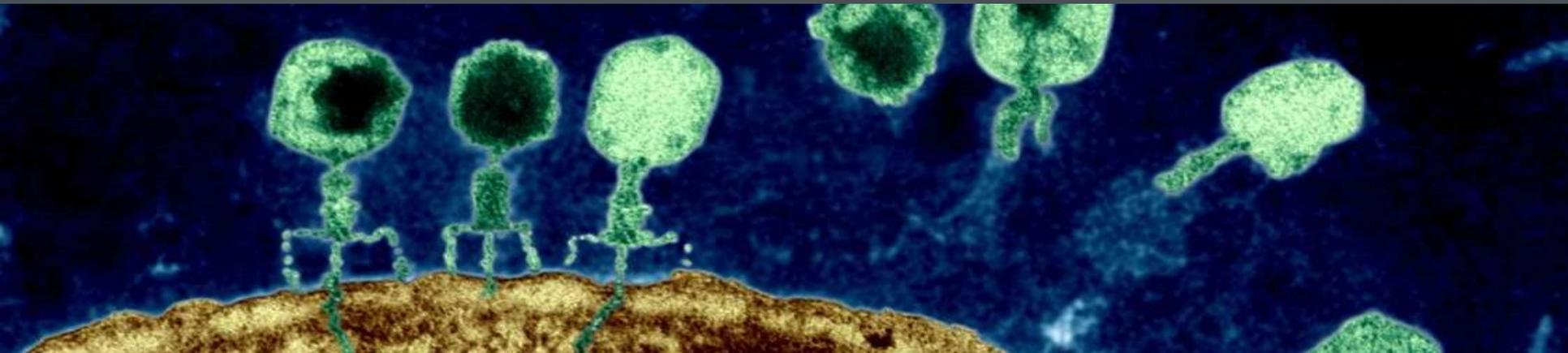
PHAGOTHÉRAPIE ET INFECTIONS OSTÉO-ARTICULAIRES

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES

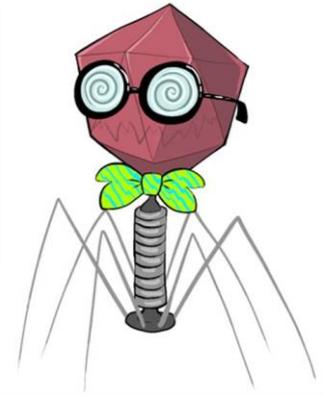
Dr Sarrah BOUKTHIR
Service de Bactériologie et Hygiène
Hospitalière



9^{ème} réunion bibliographique du CRIOGO – 1^{er} juillet 2020



Le bactériophage en quelques mots

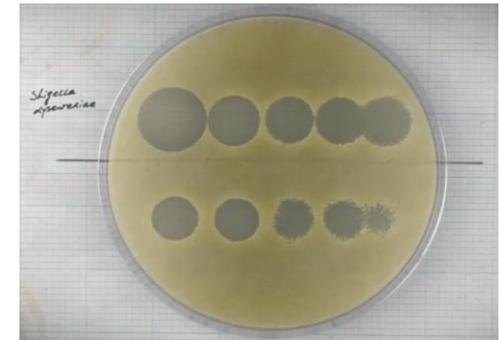


- ❑ **Virus** ayant la particularité d'infecter uniquement les bactéries (incapables d'infecter les cellules eucaryotes)
- ❑ Activité **bactéricide** (lyse bactérienne)
- ❑ Grande biodiversité
- ❑ Rôle majeur dans le développement de la biologie moléculaire

Une découverte qui n'est pas si récente

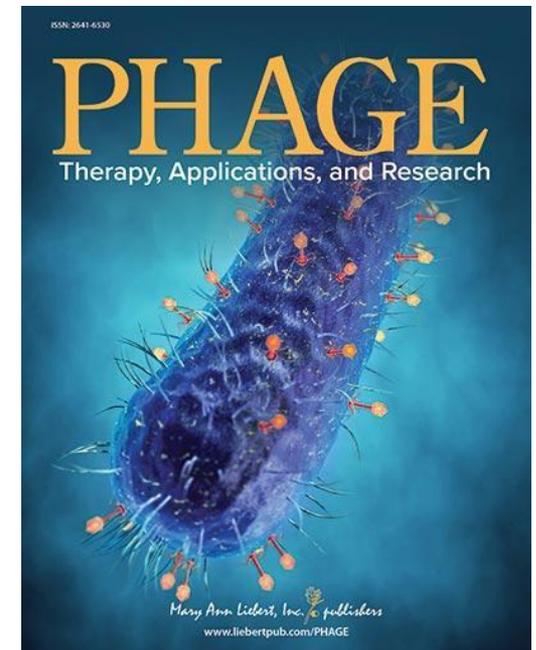
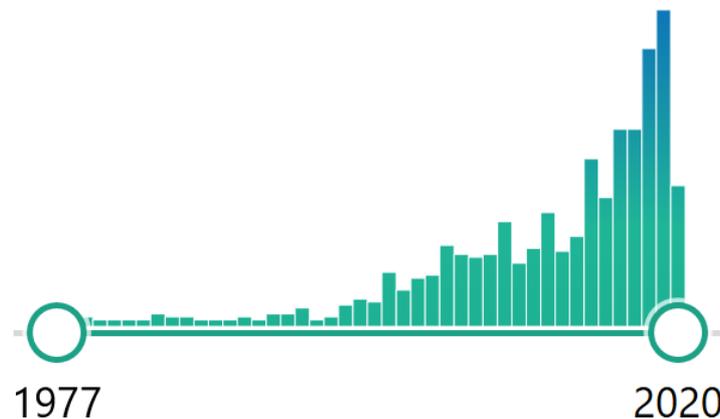
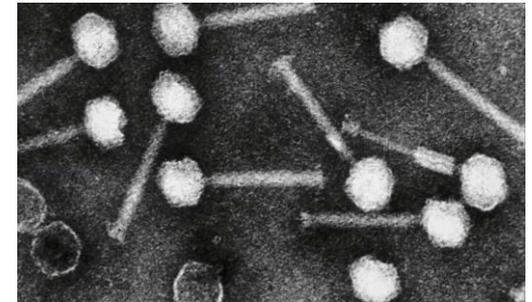


- ❑ Fin du 19^{ème} siècle: effet bactéricide des eaux du Gange et de Jumna (Ernest Hankin)
- ❑ 1915: Twort observe des zones « rongées, vitreuses » sur cultures
- ❑ 1917: utilisation du terme « bactériophage » par Felix d'Herelle
- ❑ 1919: 1^{ère} phagothérapie par Felix d'Herelle (bacilles dysentériques), nombreuses autres utilisations (choléra, peste). Essai commercialisation (1920-1930).
- ❑ Tombée dans l'oubli avec le développement des antibiotiques (à l'Ouest), scepticisme de certains...
Poursuite de son développement (Europe de l'Est)



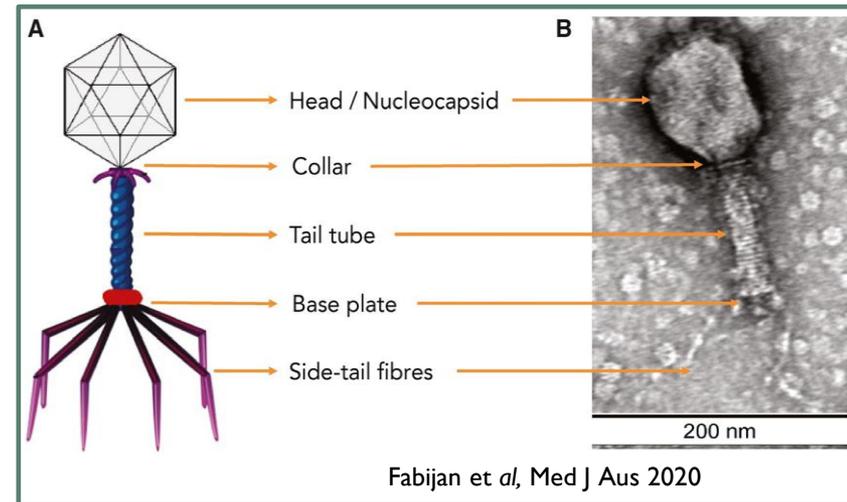
La phagothérapie revient à la mode

- ❑ Années 40: visualisation des phages (ME)
 - ❑ Amélioration des connaissances sur les phages
 - ❑ Intérêts des bactériophages dans d'autres domaines (biologie moléculaire +++)
 - ❑ Augmentation des résistances aux ATB
- => Regain d'intérêt pour cette ancienne découverte



Qu'est-ce qu'un bactériophage?

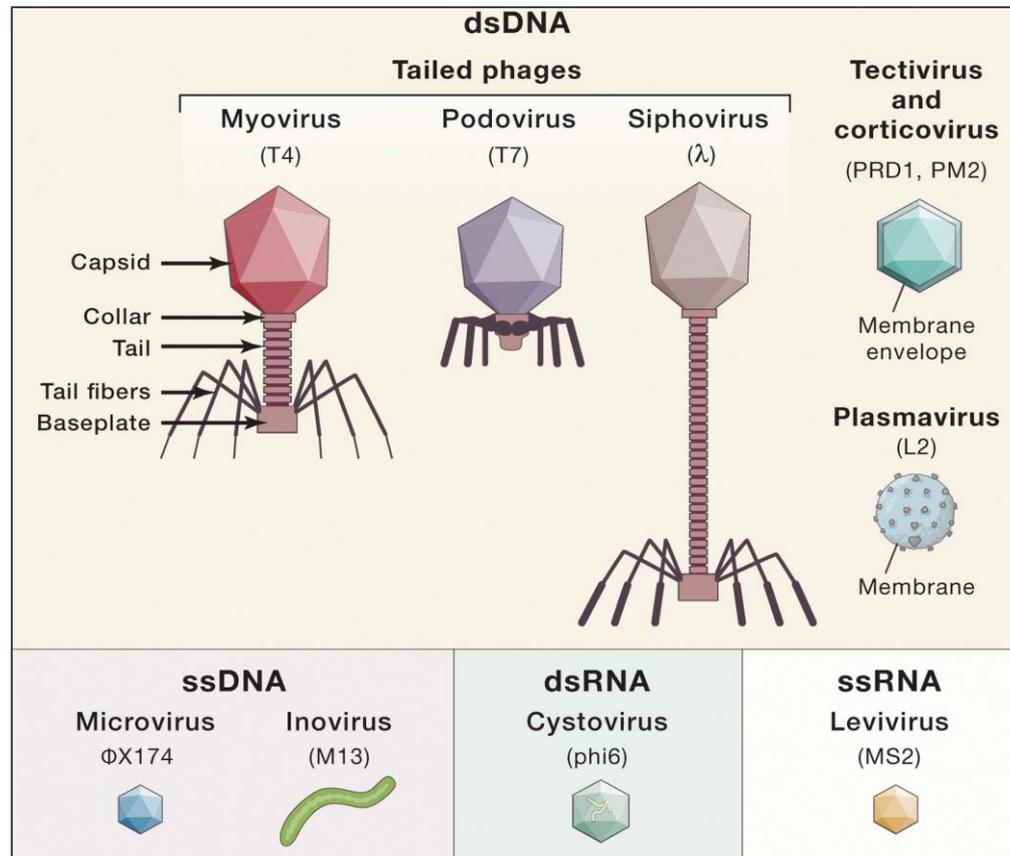
- ✓ Virus entre 20-200 nm
(*E. coli*: 500-3000 nm)
- ✓ Acide nucléique + capsid (protéines)
= nucléocapside (tête)



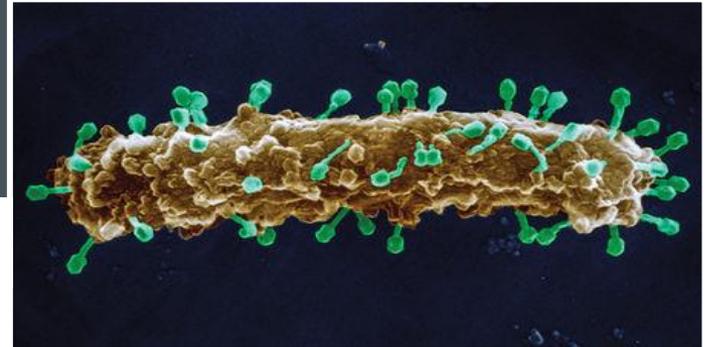
- ✓ Plus de 5000 phages différents ont été étudiés et décrits
- ✓ Résistance aux milieux extrêmes. Destruction par UV, produits chimiques, frictions mécaniques

Différents phages existent

>95% des phages: tête (capside) contenant un ADN bicaténaire + queue (tailed phages)



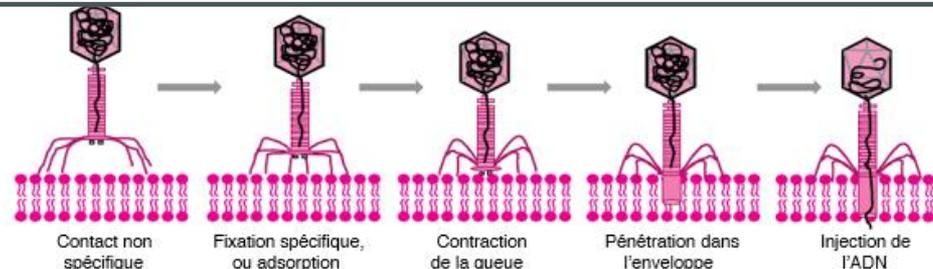
Liaison à la bactérie



- ✓ **Parasitisme obligatoire** (virus)
- ✓ Liaison **spécifique** d'un couple phage/bactérie
- ✓ Rôle de la queue du phage : adhésines ou protéines de liaison aux récepteurs (RBP = « *receptor binding protein* »)
- ✓ Fixation sur différentes protéines bactériennes (pili, flagelle, porines, LPS, ...)

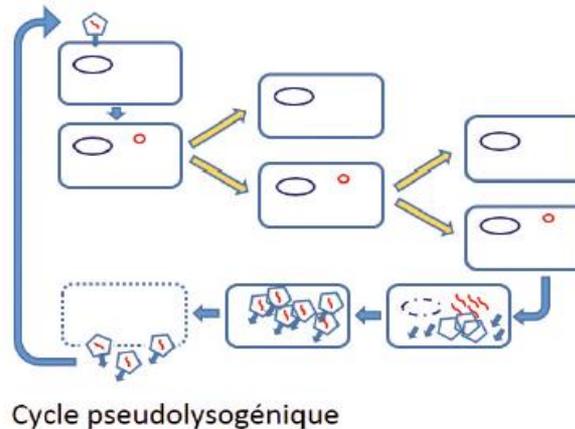
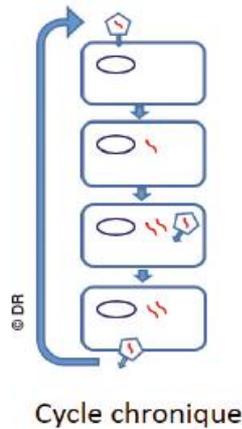
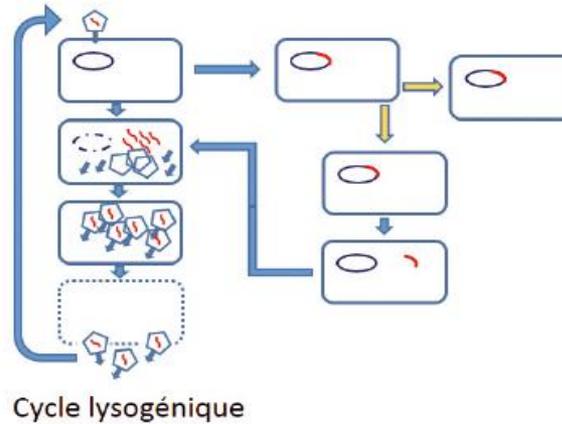
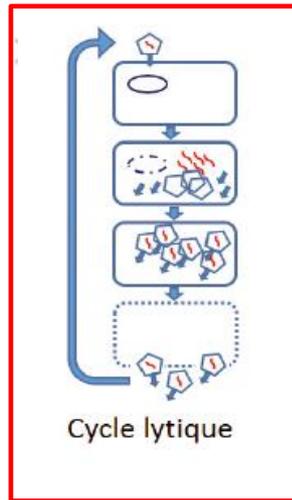
=> **3 étapes** : le contact initial entre les 2 entités, la liaison réversible et la fixation covalente (récepteur secondaire)

Spécificité du phage. Pas d'action sur les bactéries internalisées



Mécanismes d'action des phages

idéal pour la
phagothérapie



○ Chromosome bactérien
⬠ Bactériophage

○ Cellule bactérienne

⌘ Génome viral
➡ Division cellulaire

Où trouve-t-on ces phages?

- ❑ Où les bactéries se trouvent, mais en quantité plus importante
- ❑ Très grande diversité et très répandue (10^{31} phages sur Terre)
- ❑ Retrouvés dans l'environnement, chez les animaux...
 - Eau de mer: 10^6 – 10^7 phages/ml
 - 98% du « phagome » mondial reste inconnu
- ❑ Rôle important: contrôle de la prolifération bactérienne, participe au cycle carbone, transfert de gène dans l'environnement

Comment réagissent le système immunitaire et les bactéries face aux phages?

Système immunitaire

- Effets de la lyse bactérienne massive?
Immunomodulation médiée par les phages qui réduirait l'inflammation (↓ROS)
- Production d'anticorps neutralisants
durée de la protection inconnue, dépend de la voie d'administration
- Activation de l'immunité innée (controversée)
- Interaction avec le SI

Bactéries

Mécanismes de défense vav des phages

- Absence de récepteurs
- Blocage de l'injection du matériel génétique
- Infection abortive
- Résistance coordonnée (quorum sensing)
- Système CRISPR (dégradation de l'ADN/ARN viral)
- BREX (blocage machinerie bactérienne)

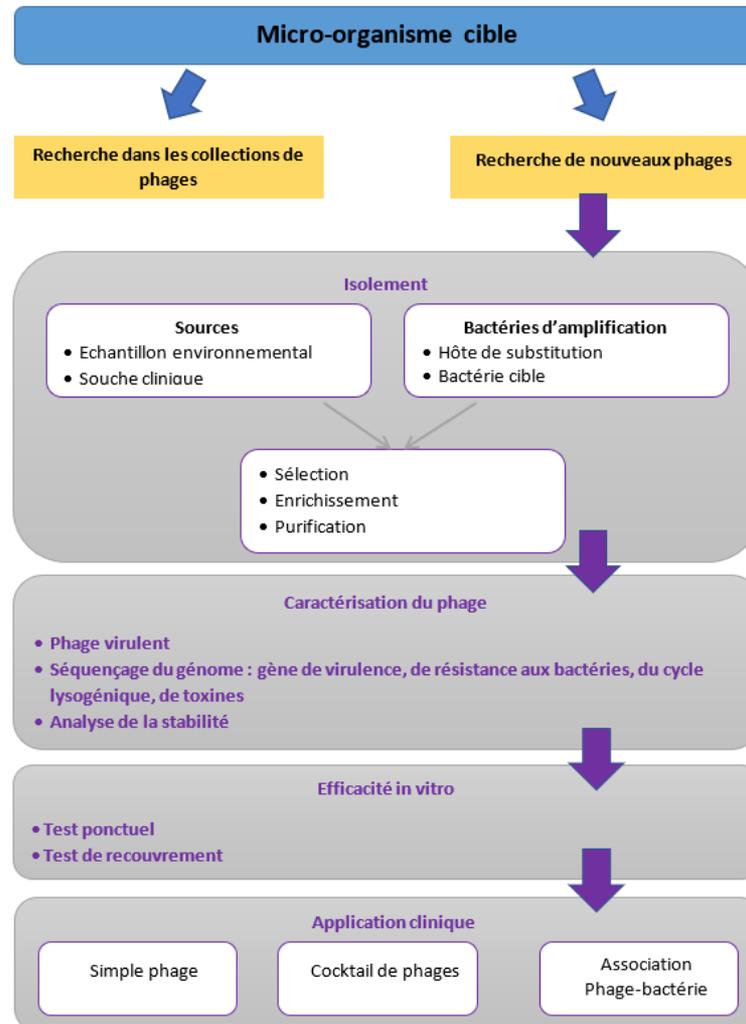
Mode d'action: cycle lytique



La phagothérapie (thérapie par les phages): les grands principes

- ✓ Utilisation des bactériophages pour le traitement d'infections bactériennes
- ✓ En France: pour les essais cliniques ou en traitement compassionnel
- ✓ 2 approches:
 - universelle (phagothérapie probabiliste): cocktails de phages ou un seul type de phage avec une large gamme d'hôte (+/- associés à des ATB)
 - **phagothérapie adaptée**
- ✓ Étapes nécessaires:
 1. Isolement des bactéries pathogènes (utilisation de phages spécifiques)
 2. Tester l'activité de différents phages sur cette/ces souches bactériennes
(laboratoire français Pherecydes Pharma ou de l'hôpital militaire de la Reine Astrid en Belgique)
 3. Préparation magistrale des phages dans les pharmacies

La phagothérapie (thérapie par les phages): les grands principes



Application: théorie

□ Comment se fournir en phages?

2 moyens: recours à une phagothèque ou les chercher dans l'environnement

□ Comment sélectionne-t-on les phages?

Sélection en fonction de leur activité bactéricide spécifique d'une souche donnée (infection en cours)

Nécessité d'avoir une collection importante de phages

□ Phagogramme?

Évaluer la sensibilité des phages à une gamme de bactéries (hôtes)

Visualisation de zone de lyse après dépôt d'une préparation de phage sur une culture bactérienne

Étude de la sensibilité d'un phage

2 méthodes peuvent être utilisées

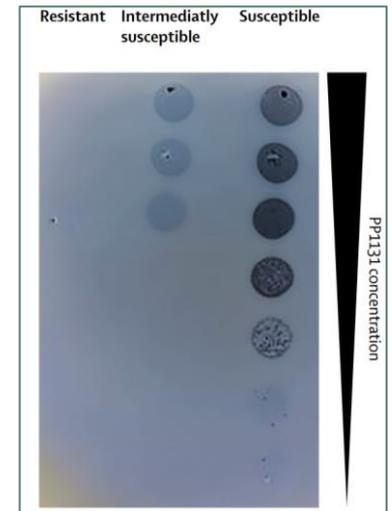
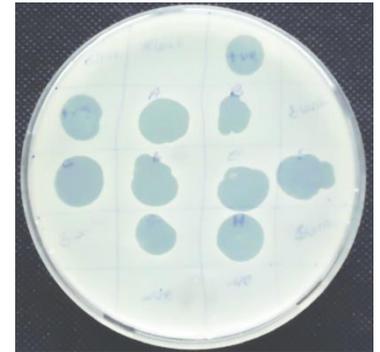
(au préalable, fixation des bactéries cibles sur gélose)

- le « spot test »: préparation de phages déposées sur le tapis bactérien
- le double recouvrement sur gélose: dépôt d'une solution de phages à des concentrations différentes

Sensibilité aux phages = apparition d'une zone d'inhibition de croissance appelée **PFU** (Plaque forming units)

⇒ calcul du **score EOP** « **Efficiency of plating** » = nb de PFU avec la souche testé/Nb PFU avec la souche de référence

Plus le score est proche de 1, plus la bactérie est sensible aux bactériophages



Utilisations cliniques de la phagothérapie de nos jours



- ❑ Engouement pour la phagothérapie ces dernières années
- ❑ Utilisation de la phagothérapie dans différents domaines:
ulcères chroniques, infections pulmonaires, otites, infections urinaires,...
- ❑ Nombreuses bactéries ciblées: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, ...
- ❑ PhagoBurn (Lancet Infect Dis 2019): 1^{er} essai contrôlé randomisé
- ❑ Utilisation à visée anti-*Listeria*, anti-*Salmonella* (agroalimentaire)
- ❑ Tourisme médical notamment en Georgie

Perspectives

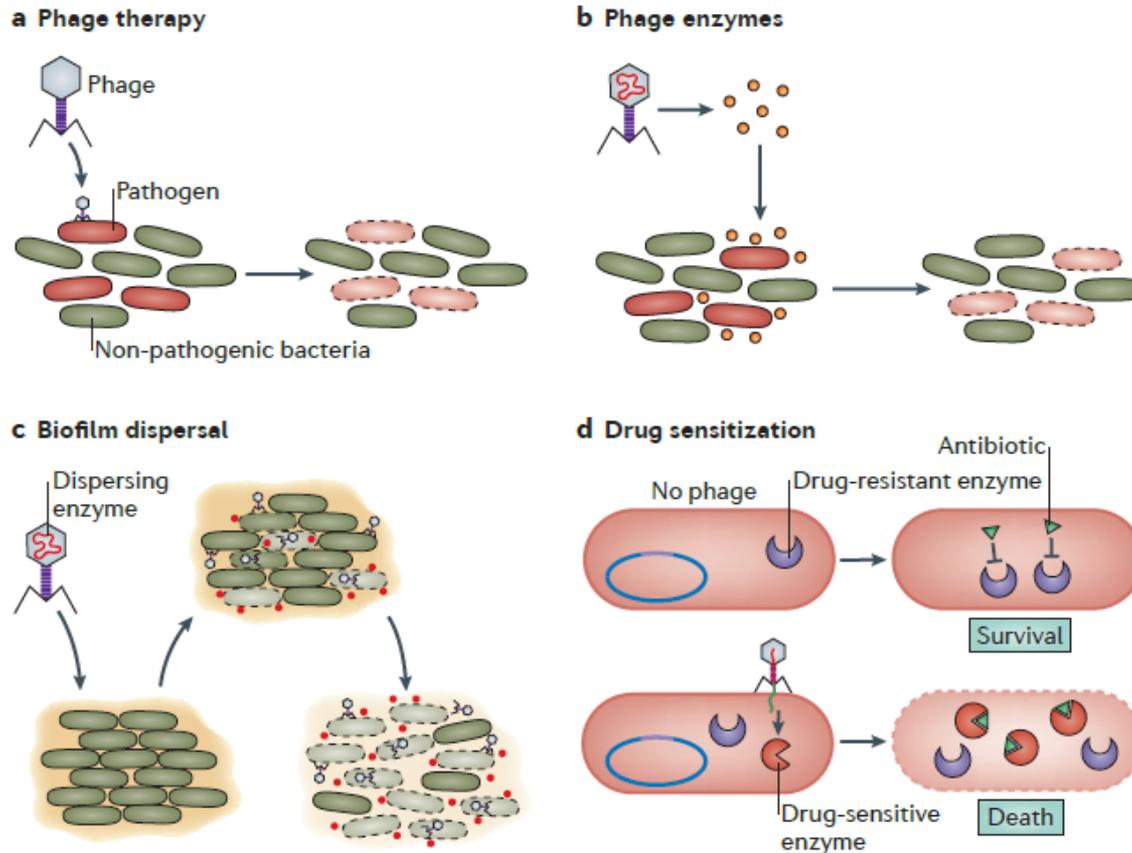


Figure 3 | Some phage-inspired antimicrobial approaches. Phages and their products provide routes that could lead to the creation of novel antimicrobial strategies. **a** | The specificity of phages can be explored for phage therapy, by which phages target particular bacterial pathogens. **b** | Phage products, such as enzymes, can be used to target specific bacteria, including pathogens. **c** | Phages can be used to disrupt biofilms, by targeting bacteria embedded in these structures, and can be engineered to release specific enzymes that degrade the biofilm matrix. **d** | Phages can be used to sensitize antibiotic-resistant bacteria. For example, phages can introduce antibiotic-sensitive genes into drug-resistant hosts, and this strategy can be combined with antibiotic treatment.

Quid des infections ostéo-articulaires?

a. Études in vitro

- ✓ Objectif: vérifier l'efficacité des phages contre les bactéries et leur biofilm associé
- ✓ Étude de Morris et *al.* 2019
 - activité antibactérienne des phages spécifiques contre les souches de *S. aureus*
=> inhibition de la croissance bactérienne des deux souches à 98,3% et à 88,3%
 - activité sur le biofilm: utilisation d'implant en titane + biofilm
 - ⇒ réduction de l'épaisseur et de la surface du biofilm après 48h de contact avec les phages
 - ⇒ mêmes implants biofilmés incubés avec de la céfazoline (c° > 100 CMI): meilleur effet bactéricide des phages

Quid des infections ostéo-articulaires?

b. Études in vivo (animaux)

Table 1. Overview of Animal Studies Utilizing Phage to Treat Orthopedic Infections

Author	Animal and Condition	Bacteria and Inoculation Route	Phage and Concentration Delivered (PFU/ml)	Design	Key Findings
Yilmaz et al ⁴⁷	Sprague-Dawley Albino Rat	MRSA	Sb-1 (MRSA) 1×10^8	OM model in 48 rats, each for MRSA and <i>P. aeruginosa</i>	MRSA infection: Combination therapy cleared biofilm, and lead to 90% reduction in CFU compared to control ($p = 0.004$)
	OM	<i>P. aeruginosa</i>	PAT14 (<i>P. aeruginosa</i>) 1×10^8	Each group subdivided into four groups: No treatment, antibiotic, phage, and combination After confirmation of infection (14 days), treatment administered: Phage therapy 3 consecutive days, antibiotics 14 days Phage delivered via intralesional injection 0.1 mL/day for 3 days	<i>P. aeruginosa</i> infection: Significant reduction in CFU in all treatments; combination therapy most effective with 88% reduction ($p < 0.001$). No significant change in biofilm thickness
Kishor et al ⁴⁸	Rabbit	MRSA	Homemade cocktail 5×10^6	OM induced via inoculation of distal femur using clinical isolates of MRSA	Group B: Wound swabs became culture negative after 4th dose; minimal radiographic OM changes
	OM	Intramedullary injection		Phage therapy utilized 3 weeks after infection (group C), 6 weeks after infection (group B), or no therapy (group A) Phage delivered via intralesional injection 15 μ L every 48 h for 1 week Retrograde femoral wire inserted into tibia, and canal inoculated with MRSA	Group C: Wound swabs culture negative 2 weeks after therapy, wound healed, persistent radiographic OM changes
Kaur et al ⁴⁹	BALB/c mouse	MRSA (43300)	MR-5 1×10^9		Combination therapy resulted in the most significant decrease in initial bacterial adherence compared to other groups, and significantly less bacterial burden on adjoining tissue prior to clearance of infection
	PJI	Intramedullary injection		Phage, antibiotic, or combination was mixed with HPMC gel and coated onto wire. Naked wire and just HPMC were controls Mice were sacrificed at days 1,3,5,7,10,15, 20 and outcomes were measured	Combination therapy led to faster restoration of locomotion

OM, osteomyelitis; PJI, prosthetic joint infection; HPMC, hydroxypropylmethylcellulose; MRSA, methicillin resistant *S. aureus*.

Kaur et al, PlosOne, 2016. In Vivo Assessment of Phage and Linezolid Based Implant Coatings for Treatment of Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) Mediated Orthopaedic Device Related Infections.

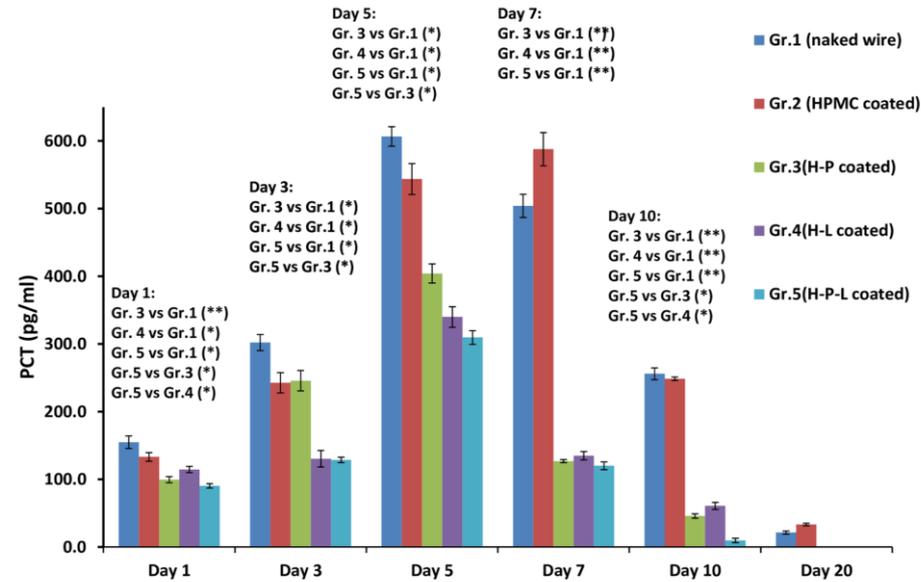
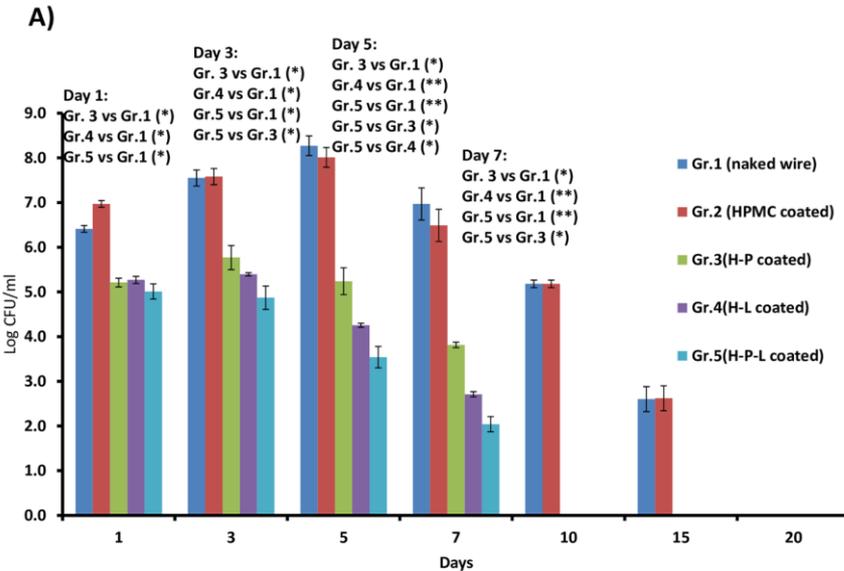


Fig 4. A) Bacterial load (Log CFU/ml) in the adjoining joint tissue of mice on different days post infection with *S. aureus* 43300 B) Phage titer (Log PFU/ml) in the adjoining joint tissue of mice on different days post infection with *S. aureus* 43300. Each data point represents mean \pm S.D. three (n = 3) values at each time point. p values among groups have been determined where (*) represent p<0.05 and (**) represent p<0.01.

Fig 5. Pro-calcitonin (PCT) levels in joint tissue of mice on different days post infection with *S. aureus* 43300. Each data point represent mean \pm S. D. of three values. p values among groups have been determined where (*) represent p<0.05 and (**) represent p<0.01.

Modèle murin avec implant fémoral+inoculation de SARM

→ comparer l'évolution selon le type d'implant (nu/cellulose/cellulose+phage/ cellulose+linézolide/ cellulose+phage+LZD)

Association phage+LZD

=> diminution de l'inoculum bactérien et de l'inflammation et une amélioration locomotrice rapide

Quid des infections ostéo-articulaires?

c. Publications chez l'Homme

- ✓ Étude de Monozov et al. (1946) : ostéomyélite post-opératoire (n=15) guérison complète chez 87% des patients après 2-3 semaines de phagothérapie
- ✓ Étude de [redacted] patients présentant *S. aureus* (12 mois)
des moignons
- phages
- chirurgie + ATB IV. 02,5% guérison (12 mois)
Etudes controversées
- ✓ Etude russe 2016 (Gorski et al): prothèse de hanche infectée à *S. aureus* (n=28) avec remplacement prothèse en 1 temps. Après ttt, 1/12 réinfection (phage+ATB) et 4/16 cas dans le groupe contrôle (ATB)

Quid des infections ostéo-articulaires? Peu d'études...

Table 2. Overview of Randomized Clinical Trials Conducted in Western Nations Utilizing Phage

Author and Country of Investigation	Condition and Targeted Organisms	N	Phage and Concentration Delivered (pfu/ml)	Route of Phage Administration	Design	Results
Rose et al ^{16,*} Belgium	CLVU					
	<i>P. aeruginosa</i>	9	BFC-1 1×10^9	Topical (syringe spray adapter)	Phase 1 RCT. Half of wound site was sprayed with saline, other half of wound site sprayed with phage solution. Outcomes measured 2–5 h later	Bacterial load from punch biopsies unchanged before and after, and in between groups No adverse affects reported
<i>S. aureus</i>			1 ml/50 cm ² (Mean 95 cm ²)			
Rhoads DD et al ¹⁷ USA	CVLU					
	<i>P. aeruginosa</i>	39/42	WPP-201 8×10^7	Topical	Phase 1 RCT: 18 patients received phage, 21 received normal saline once per week for 12 weeks. Follow up in 12 and 24 weeks	No adverse affects No change in healing rates, frequency
<i>S. aureus</i>			50 ml using ultrasound debridement device			
Wright et al ¹⁸ UK	COM	24	Biophage PA 6×10^5	Topical	Phase 2 RCT, double blinded. 12 patients were given a one off dose of phage solution, other half received placebo. Outcomes measured 7, 12, 21, 42 days later	Statistically significant reduction in bacterial load from baseline in phage group only Statically Significant reduction compared to baseline symptoms (VAS) in phage group only
	<i>P. aeruginosa</i>			0.2 ml injection, left in ear for 6 h		

CLVU, chronic leg venous ulcer, COM, chronic otitis media, RCT, randomized control trial, VAS, visual analog scale. *Published 2014, study took place in 2008.

Quid des infections ostéo-articulaires?

c. Publications chez l'Homme

- ✓ Ferry et *al.* , Virologie 2020

Rapporte des cas d'échecs et de succès de la phagothérapie

Succès du CRIOAc de Lyon: infection chronique sur prothèse (lavage+injection d'un cocktail de phages)

⇒ Nécessité d'essai de phase II/III

d. À venir:

- ✓ Projet PHOSA (2014-2017): développer des phages ayant une action sur les souches de *S. aureus*
- ✓ PHAGOS: but d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la phagothérapie chez des patients ayant une infection de prothèses de hanche ou de genou à *S. aureus*

Association phage-antibiotique

- ✓ Utilisation des ATB à une concentration sub-inhibitrice
=> modification de la morphologie des bactéries/ralentissement du phénomène de lyse => accumulation des phages
- ✓ Amélioration de l'éradication des biofilms:
 - Pénétration des phages dans le biofilm de 2 façons: dégradation de la matrice (endolysines) ou migration à travers les espaces vides
 - Dégradation du biofilm par les phages => apport en oxygène+ nutriments => bactéries plus sensibles aux ATB
 - Amélioration de la diffusion des ATB
- ✓ Administration des phages avant les ATB

Modèle d'utilisation

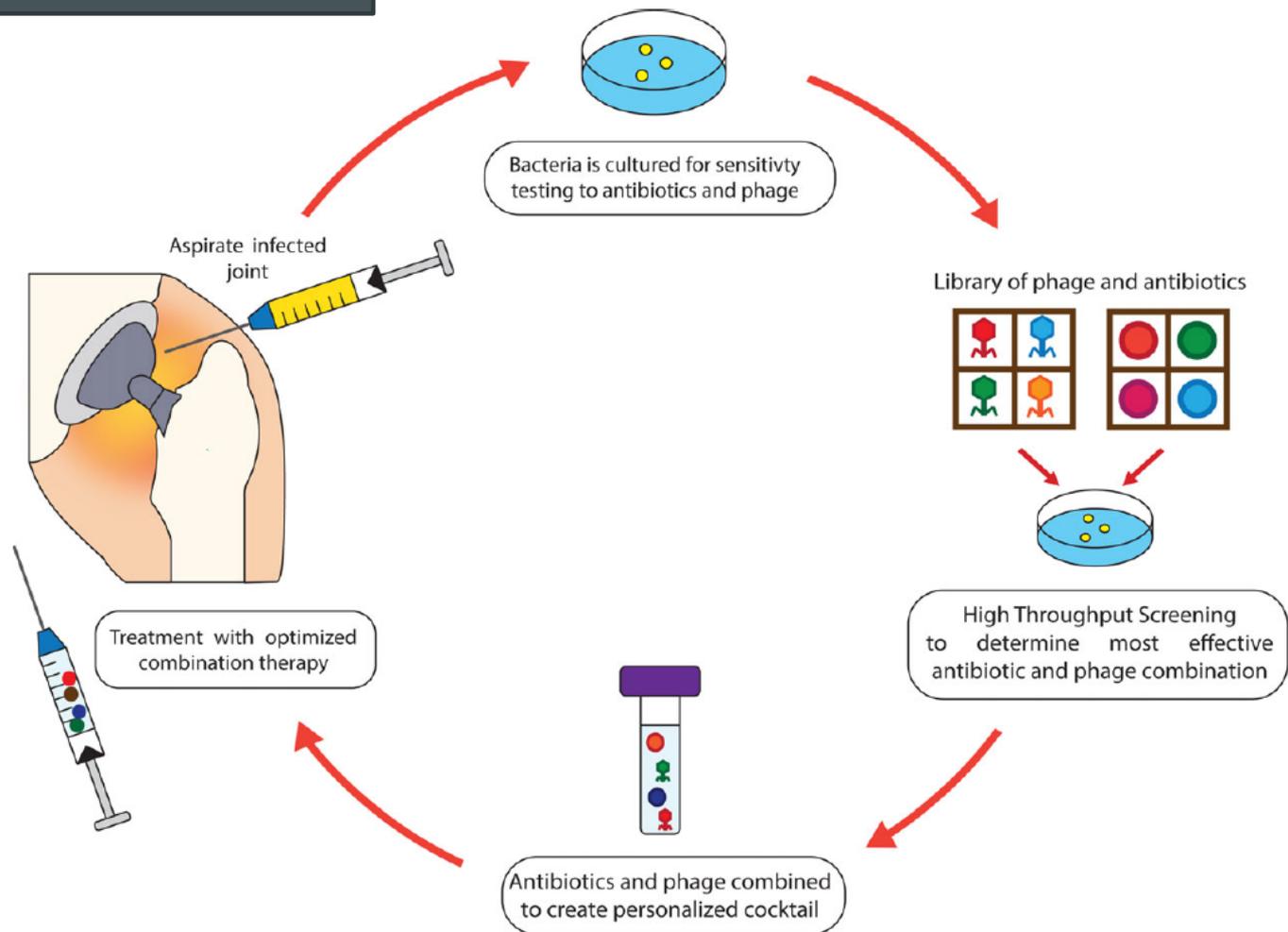
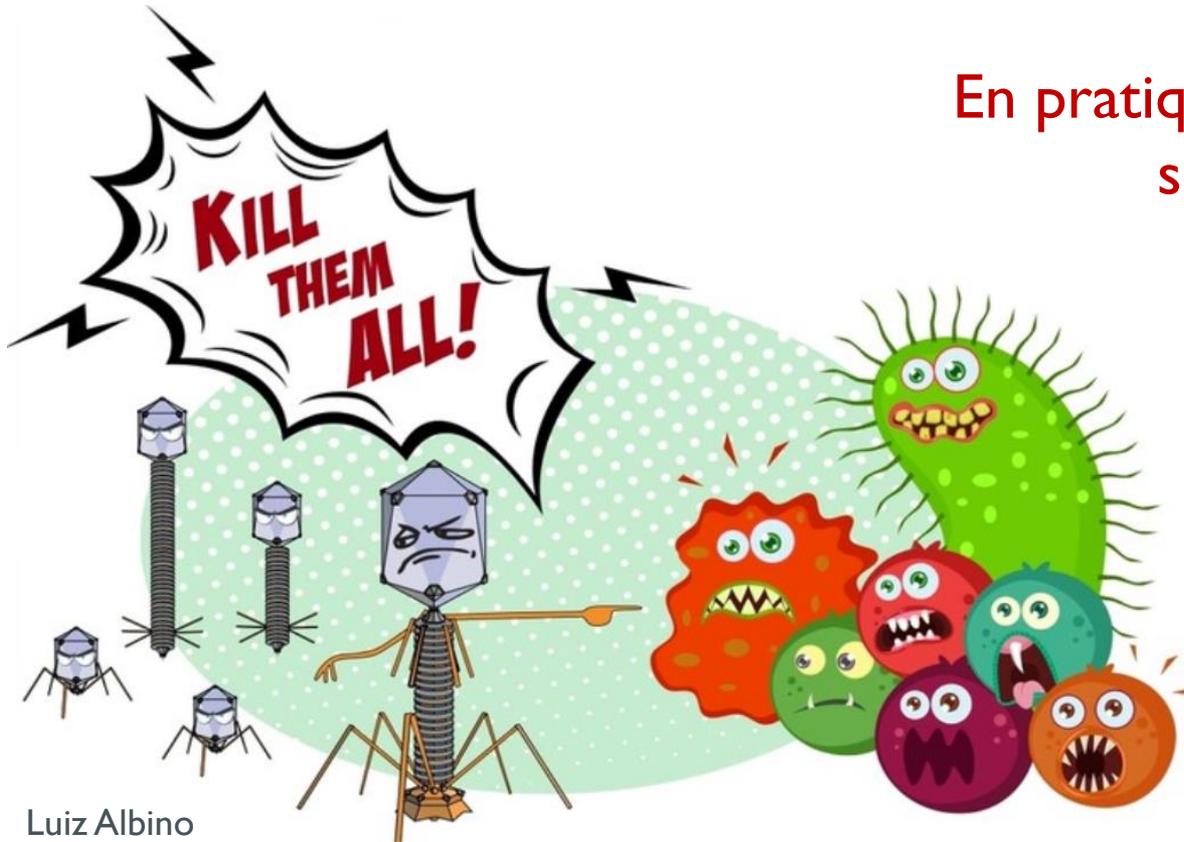


FIGURE 2. Proposed model of personalizing antimicrobial therapy to PJI. A developed library of phages and antibiotics can be utilized to create personalized therapy by creating the most effective phage and antibiotic combination to treat a patient's infection.



Luiz Albino

En pratique tout n'est pas si simple !!! ...

Merci pour votre attention

Bibliographie

- ✓ Akanda ZZ, Taha M, Abdelbary H. 2018. Current review-The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *J Orthop Res* 36:1051–1060.
- ✓ Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. 2017. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Curr Microbiol* 74:277–283.
- ✓ Danis-Wlodarczyk K, Dąbrowska K, Abedon ST. 2020. Phage Therapy: The Pharmacology of Antibacterial Viruses. *Curr Issues Mol Biol* 40:81–164.
- ✓ Fabijan AP, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I, Lin RC, Zakour NB, Venturini C, Bowring B, Iredell JR. 2020. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Medical Journal of Australia* 212:279–285.
- ✓ Ferry T, Kolenda C, Gustave C-A, Lustig S, Josse J, Batailler C, Pirot F, Leboucher G, Laurent F. 2020. Phage therapy in bone and joint infection: history, scientific basis, feasibility and perspectives in France. *Virologie (Montrouge)* 24:49–56.
- ✓ Hobbs Z, Abedon ST. 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with “Lytic or lysogenic.” *FEMS Microbiol Lett* 363.
- ✓ Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Le Floch R, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Bretaudeau L, Gabard J. 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.
- ✓ Kaur S, Harjai K, Chhibber S. 2016. In Vivo Assessment of Phage and Linezolid Based Implant Coatings for Treatment of Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) Mediated Orthopaedic Device Related Infections. *PLoS ONE* 11:e0157626.

Bibliographie

- ✓ Morris J, Kelly N, Elliott L, Grant A, Wilkinson M, Hazratwala K, McEwen P. 2019. Evaluation of Bacteriophage Anti-Biofilm Activity for Potential Control of Orthopedic Implant-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Surg Infect (Larchmt)* 20:16–24.
- ✓ Nicolas Dufour, Anne Chevallereau, L. Debarbieux. (16) (PDF) Les bactériophages: Comment ces virus alliés fonctionnent-ils? ResearchGate.
- ✓ Ofir G, Sorek R. 2018. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* 172:1260–1270.
- ✓ Paolozzi L. Microbiologie: biologie des procaryotes et de leurs virus : [licence, master, écoles d'ingénieurs. Paris: Dunod; 2015.
- ✓ Patey O, McCallin S, Mazure H, Liddle M, Smithyman A, Dublanche A. 2018. Clinical Indications and Compassionate Use of Phage Therapy: Personal Experience and Literature Review with a Focus on Osteoarticular Infections. *Viruses* 11.
- ✓ Pires DP, Costa AR, Pinto G, Meneses L, Azeredo J. 2020. Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiol Rev*.
- ✓ Rohde C, Wittmann J, Kutter E. 2018. Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *Surg Infect (Larchmt)* 19:737–744.
- ✓ Salmond GPC, Fineran PC. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13:777–786.
- ✓ Van Belleghem JD, Dąbrowska K, Vaneechoutte M, Barr JJ, Bollyky PL. 2018. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses* 11.