

CONCOURS GENERAL DES LYCÉES

Spécialité : Biotechnologies

Session 2016

Épreuve d'admission

Durée totale de l'épreuve : 6 h

Exploitation d'informations scientifiques et présentation d'un travail de synthèse : 1,5 h

Résolution expérimentale d'un problème scientifique : 4,5 h

Exploitation d'informations scientifiques et présentation d'un travail de synthèse

Durée : 1,5 h (préparation 1 h et soutenance orale 30 minutes)

La multirésistance des bactéries aux antibiotiques conduit les autorités de santé et les scientifiques à rechercher des méthodes thérapeutiques alternatives pour lutter contre les maladies infectieuses bactériennes.

On s'intéresse de nouveau à la phagothérapie découverte au début du XX^{ème} siècle et laissée de côté car supplantée par l'antibiothérapie.

Un article récent extrait des *Annals of Burns and Fire Disasters*-vol. XXVIII-n.1 -Mars 2015, intitulé « Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes », co-écrit par des chercheurs des Hôpitaux de Lyon, Clamart et Romainville, présente la phagothérapie et les espoirs qu'elle suscite.

Une vidéo : « Des bactériophages pour lutter contre les infections » (2,31 minutes) résume le principe de la phagothérapie.

Après avoir visionné la vidéo et lu l'article, préparer un exposé oral de 15 minutes.

Quelques précisions pour la préparation de l'exposé :

1. À partir de l'article, de la vidéo et de connaissances, schématiser sur le transparent fourni les principales étapes du cycle lytique d'un bactériophage. Ce schéma sera commenté à l'oral.

2. Produire, en vue de la présentation orale, une note de synthèse décrivant le mécanisme de multiplication des bactériophages, leurs principales caractéristiques utiles à la phagothérapie, les avantages et limites de la phagothérapie comparée à l'antibiothérapie et l'intérêt qu'il y aurait à combiner les deux traitements.

Résolution expérimentale d'un problème scientifique

Durée : 4,5 h

La lutte contre les bactéries en ce début de XXI^{ème} siècle est devenue très délicate : apparition et sélection (du fait de l'usage croissant d'antibiotiques) de bactéries résistantes aux antibiotiques (voire multi-résistantes), dispersion très rapide des bactéries à la surface de la planète, très faible nombre de nouvelles molécules antibiotiques mises sur le marché depuis les années 1990, apparition d'infections nosocomiales...

La lutte contre les bactéries nécessitera donc de nouvelles stratégies dans le siècle à venir. L'une d'entre elles est l'utilisation des phages (virus qui infectent naturellement les bactéries et les détruisent). Cette piste explorée et utilisée, depuis les années 1930, avec succès en Géorgie notamment, n'a jamais connu de développement important. Aujourd'hui de nombreux microbiologistes pensent qu'il faut l'explorer de nouveau en profitant des techniques modernes de biologie moléculaire : c'est la phagothérapie moderne.

L'utilisation du lysozyme (premier antibiotique découvert par A. Fleming en 1922) est aussi une alternative. Cette molécule est déjà utilisée dans certaines préparations pharmaceutiques et comme conservateur dans l'industrie alimentaire. Le lysozyme extrait du blanc d'œuf de poule est le plus utilisé.

Le sujet comporte deux parties :

- étude de l'efficacité antibactérienne de bactériophage T2 ;
- étude de l'efficacité antibactérienne d'une solution de lysozyme.

Partie 1 - Mesure in vitro de l'efficacité d'un bactériophage pour la lutte anti-bactérienne

L'utilisation des bactériophages suscite à nouveau de l'intérêt pour lutter contre les bactéries responsables d'infections, en raison notamment du nombre croissant de bactéries résistantes aux antibiotiques. Au cours de cette étude la bactérie modèle *E.coli* et le bactériophage T2 ont été retenus pour évaluer l'efficacité de ce type d'approche.

Matériel

Culture d'*E. coli* sur milieu Luria Bertani (LB) sensible au phage T2 en phase exponentielle de croissance. L'absorbance à 600 nm de la culture est fournie.

Données :

- $A_{600\text{ nm}} =$
- Suspension de phage T2 à environ 10^9 phages.mL⁻¹
- Milieu LB stérile
- P1000
- Cône bleu stérile
- Semi-microcuve
- Spectrophotomètre

Méthode

Principe

La bactérie retenue est *E. coli*, la culture est réalisée en milieu liquide, le phage choisi est un phage virulent, le phage T2.

L'addition du phage T2 est effectuée sur une culture d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance à environ : 10^6 bactéries.mL⁻¹, avec une multiplicité d'infection suffisante (cf. annexe 2).

L'effet des bactériophages est suivi par la mesure de l'absorbance à 600 nm ce qui permet de visualiser la lyse des bactéries.

En parallèle une culture témoin d'*E.coli* sans bactériophage est réalisée et suivie dans les mêmes conditions.

Mode opératoire

Caractéristiques des cultures et inoculation des phages

2 cultures sont fournies. Les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. Le volume des cultures est de 50 mL.

La suspension de phages est à environ 10^9 phages.mL⁻¹.

Inoculation

- Noter les 2 cultures d'*E.coli* : T (témoin) et Φ (culture avec bactériophages)
- Arrêter l'agitation des cultures
- Inoculer Φ avec **1 mL** de la suspension phagique
- Inoculer T avec 1 mL de milieu de culture stérile
- Mesurer immédiatement l'absorbance à 600 nm des cultures T et Φ (cf. § « Suivi de la population bactérienne ») contre du milieu stérile. **C'est le t_0 du suivi**

- Agiter manuellement en réalisant 2 à 3 rotations de la fiole d'Erlenmeyer
- Laisser les cultures 5 min sans agitation
- Remettre sous agitation et poursuivre le suivi de la population bactérienne comme indiqué ci-dessous

QP1. A partir des données ci-dessus et des documents annexes calculer la « Multiplicity of infection » (MOI) et déduire le pourcentage de bactéries infectées dans la culture Φ .

Suivi de la population bactérienne

Prélever de façon aseptique 1 mL de culture et transvaser dans une semi-microcuve

Fermer avec du parafilm

Agiter et mesurer immédiatement l'absorbance à 600 nm au spectrophotomètre

Éliminer les cuves au poste de mesure dans le bécher contenant de l'Anios®.



La limite de linéarité est d'environ 0,6 uA, au-delà de cette valeur il faudra diluer l'échantillon avec du milieu LB.

Mesurer l'absorbance à 600 nm toutes les 15 min. environ, reporter les valeurs sur le tableur fourni. Afficher la courbe de suivi dès l'obtention de 5 valeurs (soit au bout de 60 minutes) ; suivre l'absorbance durant 150 minutes.

Résultats et discussion

- Q1. Compléter l'annexe A (tableur).
Q2. Tracer les courbes pour les 2 cultures $A_{\text{corrigée}} = f(t)$ et $\ln A_{\text{corrigée}} = f(t)$, superposer ces courbes. Donner un titre. Les imprimer.
Q3. Sur les graphes repérer, si elle existe, la phase exponentielle de croissance.
Q4. À partir du suivi de Φ , déterminer la durée nécessaire pour observer un arrêt de la croissance et le début d'une mortalité bactérienne. En déduire l'ordre de grandeur de la durée d'un cycle lytique.
Q5. Déterminer le pourcentage de lyse des bactéries à $t = 180$ min à partir de la formule suivante :

$$P_l = \left(1 - \frac{A_{\Phi \text{ corrigée}}}{A_{T \text{ corrigée}}}\right) \cdot 100$$

- Q6. Conclure sur l'efficacité du phage T2 pour limiter la multiplication d'*E. coli*.
Q7. Démontrer la formule précédemment utilisée.

Partie 2 – Étude de l'efficacité antibactérienne d'une solution de lysozyme

Le lysozyme est une **enzyme** de défense contre les bactéries, présente dans la salive, les larmes, les muqueuses des animaux. Le substrat du lysozyme est une macromolécule complexe, **le peptidoglycane** (la principale molécule de **la paroi des bactéries** Gram +).

Afin d'évaluer l'efficacité d'une solution T de lysozyme, il faut :

- déterminer la concentration massique en protéines dans la solution T de lysozyme, notée $C_{m(\text{protéines ; T})}$;
- déterminer la concentration d'activité catalytique de la solution T de lysozyme, notée b_T ;

L'activité spécifique de la solution T de lysozyme, notée z_{sp} pourra alors en être déduite.

Dosage spectrophotométrique des protéines dans une solution de lysozyme par la méthode de Bradford

Principe

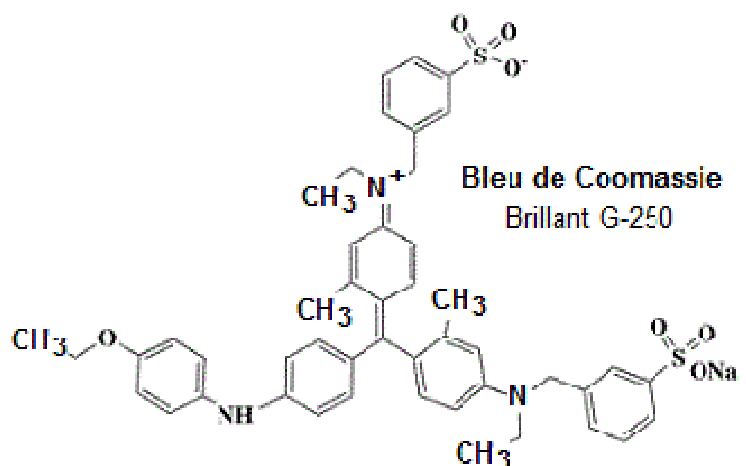
Méthode spectrophotométrique fondée sur la formation d'un complexe coloré entre certaines régions des protéines et le colorant Brillant Blue G-250 ou Bleu de Coomassie.

Lorsque ce colorant se lie aux protéines par des liaisons non covalentes, sa longueur d'onde d'absorption maximale augmente de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

Attention : les résultats de mesure d'absorbance obtenus par cette méthode ne sont pas toujours linéaires mais parfois modélisables par une branche d'hyperbole

Matériel

- Réactif de Bradford contenant le Bleu de Coomassie
- Solution étalon de séralbumine bovine (SAB) à $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$
- Solution de contrôle SC à $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéines
- Solution T de lysozyme à tester
- Microcuvettes
- P100 (ou P200), P1000 et cônes
- Spectrophotomètre



Mode opératoire

Réalisation de la gamme d'étalonnage

Réaliser une gamme étalon contenant entre 0 et 25 µg de solution de SAB étalon par micro-cuve. Tester : 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 µg.

Le tube « 0 » donne le volume final imposé dans tous les tubes, soit 1,100 mL.

Un contrôle sera réalisé dans les mêmes conditions opératoires avec la solution SC :

$$C_{m(\text{protéines ; SC})} = 200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$$

QP2. Compléter le tableau ci-dessous et le montrer à l'examinateur avant de réaliser la manipulation.

Tableau 1 :

| | | Blanc « 0 » | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | Essai T | C |
|--|----|----------------|----|----|----|----|----|------------|-------|
| Sol étalon de SAB à 250 µg.mL ⁻¹ | mL | 0 | | | | | | | |
| Solution T de lysozyme | | | | | | | | 0,100 | |
| Solution de contrôle SC à 200 µg.mL ⁻¹ | | | | | | | | | 0,100 |
| H ₂ O qsp 0,100 mL | mL | 0,100 | | | | | | 0 | 0 |
| Réactif de Bradford | mL | 1,000 | | | | | | | |
| Agiter et laisser reposer 10 min. Mesurer l'absorbance à 595 nm. Compléter le tableau 2 | | | | | | | | | |

Détermination de l'activité lysozyme de la solution T

Méthode

Le peptidoglycane des bactéries est une structure rigide, responsable de la forme des bactéries et qui assure un rôle de protection (notamment une protection mécanique contre les différences de pression osmotique).

La présence du lysozyme (et donc de son activité, s'il n'est pas dénaturé...) se traduit par la lyse des bactéries Gram+ en milieu hypotonique par rapport au milieu intracellulaire. Les bactéries en suspension se comportent comme des particules en diffusant et absorbant la lumière. Les bactéries lysées n'ont plus cette propriété.

Une mesure du trouble d'une suspension bactérienne en présence de lysozyme dans des conditions précises (T°, pH...) permet de détecter et de mesurer facilement et rapidement l'activité du lysozyme.

QP3. Comment va évoluer l'absorbance à 600 nm en présence de lysozyme ? En absence de lysozyme ? Réponse à justifier.

Matériel

- Cuve pour lecture au spectrophotomètre (macro-cuve plastique)
- Pipette à piston P1000
- Tampon phosphate pH = 6,2 (hypotonique par rapport au milieu intra-bactérien)
- Solution T de lysozyme à tester
- Suspension de *Micrococcus lysodeikticus* en tampon phosphate pH = 6,2 (coque Gram +, isolé, dont le peptidoglycane et très sensible au lysozyme)
- Spectrophotomètre avec cuve thermostatée (si possible)
- Cristalliseur contenant une solution de détergent
- Chronomètre

Mode opératoire

Au spectrophotomètre réglé à 600 nm, réaliser les opérations suivantes :

- a. réaliser un « 0 » avec le tampon phosphate pH = 6,2 ;
- b. introduire dans une macro-cuve 2 mL de suspension de *M. lysodeikticus* ;
- c. ajouter E = 0,4 mL de la solution T ;
- d. homogénéiser, mesurer immédiatement l'absorbance à 600 nm et relever l'absorbance toutes les 10 s pendant 150 s. Compléter l'annexe B.

Tous les tests seront effectués à la même température (température de la salle, la noter).

T (°C) =

3. Résultats et discussion

Dosage des protéines :

Q8. Compléter le tableau 2 avec les valeurs d'absorbances mesurées à 595 nm.

| | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----|----------------|----|----|----|----|----|---------|---|
| Cuves | | Blanc « 0 » | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | Essai T | C |
| m protéine dans le MR | µg | | | | | | | | |
| Absorbance lue A _{595 nm} | su | | | | | | | | |

Q9. Tracer la fonction d'étalonnage $A_{595\text{ nm}} = f(m_{\text{protéines ; MR}})$. Cette méthode n'étant parfois pas linéaire mais hyperbolique, utiliser le logiciel dédié pour tracer la courbe.

$$\text{Modèle hyperbolique : } A_{595\text{ nm}} = \frac{F \cdot m_{(\text{protéines, cuve})}}{G + m_{(\text{protéines, cuve})}} \quad \left(\frac{\text{su} \cdot \mu\text{g}}{\mu\text{g} + \mu\text{g}} = \text{su} \right)$$

avec F et G les deux paramètres caractéristiques de l'hyperbole

Q10. Exprimer (équation aux grandeurs et aux unités) puis calculer ensuite la concentration massique en protéine dans le contrôle, discuter la valeur obtenue et valider éventuellement la série de mesures.

Q11. Exprimer (équation aux grandeurs et aux unités) puis calculer la concentration massique en protéine dans la solution T.

Données :

Pour l'exploitation du contrôle : $\text{Lim}_{\text{inf}} = 185 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

$\text{Lim}_{\text{sup}} = 215 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Pour le dosage des protéines : $U = 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Détermination de l'activité lysozymique :

Q12. Joindre l'annexe B au compte rendu

Q13. A l'aide des logiciels disponibles, tracer la courbe $A_{600\text{ nm}} = f(t)$ et déterminer le coefficient directeur au début de la cinétique. Joindre la courbe au compte-rendu. Compléter le tableau ci-dessous.

Tableau 3

| | $\Delta A/\Delta t =$ coefficient directeur de la droite au début de la cinétique | Activité lysozymique notée z_{cuve} (= quantité d'enzyme présente dans la cuve) | « concentration d'activité » de la solution T notée b_T $b_T = \frac{z_{\text{cuve}}}{E}$ |
|-------------|---|--|--|
| | min^{-1} | UL | UL. mL^{-1} |
| Incertitude | 0,001 | 20 | 20 |
| Solution T | | | |

Remarque :

Une unité lysozyme (UL) dans ces conditions correspond à une variation de $0,001 \text{ uA} \cdot \text{min}^{-1}$

Q14. Calculer l'activité lysozymique, z_{cuve} (équation aux grandeurs, aux unités et application numérique).

Q15. Déterminer la concentration d'activité lysozymique de T, b_T , en $\text{UL} \cdot \text{mL}^{-1}$ de solution T (équation aux grandeurs, aux unités et application numérique).

Q16. Compléter et rendre le tableau 3.

Q17. Exprimer l'activité spécifique de la solution T en $\text{UL} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéine (la noter z_{sp}), puis la calculer.

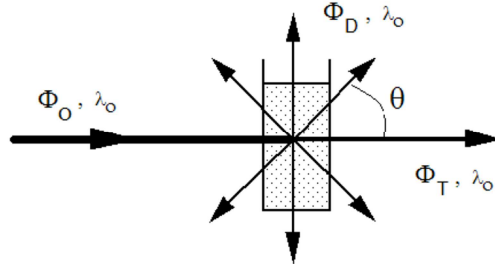
$$\text{Expression de } z_{\text{sp}} : \quad z_{\text{sp}} = \frac{b_T}{C_{m(\text{protéine, T})}} \quad \text{unités :}$$

ANNEXES

ANNEXE 1. Mesure de la biomasse par turbidimétrie

Principe :

Les particules en suspension (agrégats, bactéries, levures,..) diffusent et absorbent la lumière en plus de la lumière éventuellement absorbée par les molécules en solution. La mesure du flux diffusé (néphélémétrie) ou transmis (opacimétrie) permet dans certaines conditions de mesurer la concentration en particules de tels milieux.



Le flux transmis en opacimétrie est fonction de: la concentration en particule, leur taille, la λ utilisée, l'épaisseur de suspension traversée. La loi est du type :

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi_T} = k_{(\lambda_0, \text{taille des particules}, \theta)} \cdot l \cdot C_{\text{particules}}$$

A : absorbance, k: constante dans des conditions définies ; l: épaisseur de suspension traversée;

$C_{\text{particules}}$: concentration en particules.

La longueur d'onde utilisée est généralement comprise entre 600 et 650 nm.

La limite de linéarité est d'environ 0,6 uA. Au delà de cette valeur il faut donc diluer.

En cas de dilution on note :

$$A_{\text{corrigée}} = A_{\text{mesurée}} \cdot F_d$$

F_d : facteur de dilution utilisé pour obtenir $A_{\text{mesurée}} < 0,6$

Correspondance :

$$A_{600 \text{ nm}} : 1 \text{ uA correspond à } 7 \cdot 10^8 \text{ E. coli. mL}^{-1}$$

(source : <http://bionumbers.hms.harvard.edu/>)

ANNEXE 2. La MOI « *Multiplicity of infection* »

Ce paramètre est très important en virologie, il correspond au rapport du nombre d'agents infectieux (phage ou virus) / nombre de cellules cibles (bactéries ou cellules).

Pour un milieu donné, une culture par exemple, de volume défini :

$$MOI = \frac{n_{(phage,culture)}}{n_{(bactérie,culture)}} = \frac{C_{(phage,culture)}}{C_{(bactérie,culture)}}$$

Il permet de calculer une probabilité d'infection. La probabilité de rencontre et d'infection entre un phage et une bactérie suit une loi de probabilité appelée loi de Poisson¹.

Ainsi la probabilité qu'une cellule cible adsorbe n phage ou virus lorsqu'il y a une MOI connue notée m la probabilité P(n), s'exprime :

$$P(n) = \frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$$

Ainsi lorsque la MOI est de 1, m = 1, calculons la probabilité pour qu'une cellule soit infectée :

- par 0 phage (= non infectée) :

$$P(0) = m^0 \times e^{-1}/1 = 0,3679 \text{ soit } 36,79\% \text{ (par convention } 0! = 1)$$

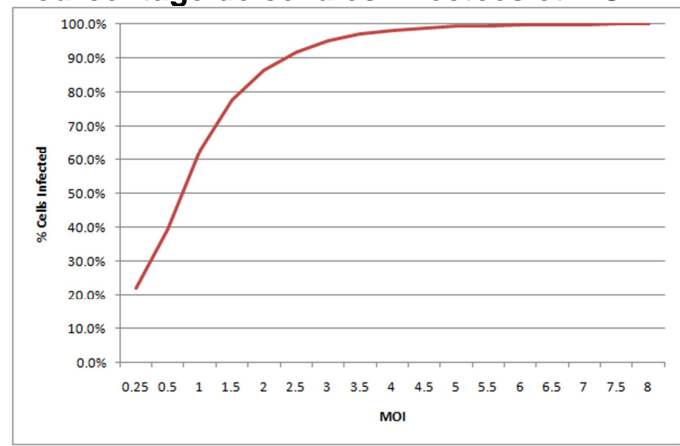
- par 1 phage :

$$P(1) = m^1 \times e^{-1}/1! = 0,3679 \text{ soit } 36,79\%$$

- par 2 phages :

$$P(2) = m^2 \times e^{-1}/2! = 0,1839 \text{ soit } 18,39\%$$

Pourcentage de cellules infectées et MOI :



Quelle est la probabilité qu'une bactérie soit infectée par au moins un phage ?

La réponse est simple si l'on écrit :

$$P(n>0) = 1 - P(0)$$

On obtient, avec m = 1 , P(n>0) = 1 - 0,3679 = 0,6321 et non 1 comme on aurait pu le penser.

¹La **loi de Poisson** est une loi de probabilité discrète qui décrit le comportement du nombre d'évènements se produisant dans un laps de temps fixé, si ces évènements se produisent avec une fréquence moyenne connue et indépendamment du temps écoulé depuis l'évènement précédent. La loi de Poisson est également pertinente pour décrire le nombre d'évènements dans d'autres types d'intervalles, spatiaux plutôt que temporels, comme des segments, surfaces ou volumes.

La loi de Poisson a été introduite en 1838 par Siméon Denis Poisson (1781–1842), dans son ouvrage *Recherches sur la probabilité des jugements en matière criminelle et en matière civile*.

<https://fr.wikipedia.org>

ANNEXE A - Disponible sur le PC (tableur), fichier « suiviculturepostei »

ANNEXE B - Cinétique de l'activité lysozymique

| Temps | A à 600 nm |
|-------|------------|
| s | |
| 0 | |
| 10 | |
| 20 | |
| 30 | |
| 40 | |
| 50 | |
| 50 | |
| 60 | |
| 70 | |
| 80 | |
| 90 | |
| 100 | |
| 110 | |
| 120 | |
| 130 | |
| 140 | |
| 150 | |

BACTÉRIOPHAGES ET PHAGOTHÉRAPIE : UTILISATION DE VIRUS NATURELS POUR TRAITER LES INFECTIONS BACTÉRIENNES

Ravat F.¹, Jault P.², Gabard J.³

¹ Centre des brûlés, Centre hospitalier Saint Joseph et Saint Luc, Lyon, France.

² Centre des brûlés, hôpital d'instruction des Armées Percy, Clamart, France.

³ Pherecydes Pharma, Romainville, France

RÉSUMÉ : L'utilisation des bactériophages, prédateurs naturels des bactéries, est une technique pionnière efficace de lutte contre les infections bactériennes. Tombée dans l'oubli depuis un demi-siècle du côté occidental de l'ex-rideau de fer, elle fait toujours partie de l'arsenal thérapeutique des pays de l'ex-Europe de l'Est, au point de constituer une arme de choix dans la politique de santé publique de ces pays. L'émergence de bactéries multirésistantes et le risque de revenir à l'ère pré-antibiotique ont fait ressortir la phagothérapie de l'oubli injuste auquel elle avait été confinée. La biologie et la place du bactériophage dans la nature sont décrites ici. Les tenants et les aboutissants de la phagothérapie et les conditions de son retour sur le devant de la scène sont explicités.

Mots-clés : bactériophage, phagothérapie, infection, brûlure, résistances bactériennes

INTRODUCTION : L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de moyens thérapeutiques ont ramené sur le devant de la scène une thérapeutique ancienne que l'occident avait oubliée : la phagothérapie. Cette méthode consiste à mettre à profit les armes que l'évolution a créées pour lutter contre les bactéries. Ces armes sont des virus : les bactériophages.

Historique

C'est en observant des « plages claires » au sein d'une culture de bactéries sur gélose en 1917 que le franco-canadien Félix d'Hérelle a formulé l'hypothèse d'une part que ces plages claires correspondaient à une lyse bactérienne et d'autre part que cette lyse pouvait être provoquée par un agent inconnu qu'il a appelé « microbe filtrant ». Poursuivant son hypothèse d'un « microbe tueur de microbes », qu'il appellera bactériophage, d'Hérelle isole en quelques mois des phages actifs contre plusieurs espèces bactériennes.³ Dès 1918, il imagine un usage thérapeutique du bactériophage,⁴ qu'il concrétise en 1919 par le traitement (avec succès) d'enfants victimes de dysenterie bacillaire hospitalisés à l'hôpital Necker de Paris.⁵ La phagothérapie est née. La méthode proposée par d'Hérelle fait la preuve de son efficacité avec notamment le traitement de cas de peste en Egypte durant l'année 1925⁶ et son utilisation pour juguler une épidémie de choléra en Inde en 1926.⁷ En 1933 Georgi Eliava, un élève de Félix d'Hérelle, crée à Tbilissi (République de Géorgie) « l'institut du bactériophage », première institution au monde intégralement consacrée au bactériophage et à ses applications thérapeutiques.⁸

Après les premiers succès sont venus les premiers échecs, faisant naître les premiers doutes et les premières polémiques. L'explication des échecs et des polémiques qui en ont découlé tient au fait que l'agent à l'origine de l'efficacité de la méthode – le bactériophage – n'avait pas encore été observé à l'époque. Il faudra pour cela attendre l'invention du microscope électronique pour permettre à H. Ruska de photographier le premier bactériophage en 1940. D'autre part de nombreux médecins n'avaient pas la rigueur de Félix d'Hérelle pour la préparation de bactériophages à usage thérapeutique, ceci expliquant les échecs.⁹

Le coup de grâce a été porté à la phagothérapie par deux événements successifs : la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 puis la seconde guerre mondiale, qui a généré des besoins immenses en traitements anti-infectieux. Dans ces conditions il est facile de comprendre la production de masse d'antibiotiques (plus aisés à fabriquer, plus stables et plus simples d'emploi), suivie de la montée en charge des grandes firmes pharmaceutiques. En trois ou quatre décennies va naître une trentaine de nouvelles molécules antibiotiques générant d'immenses espoirs thérapeutiques. L'abandon progressif de la phagothérapie sera le pendant de cet âge d'or des antibiotiques.

Heureusement pour la phagothérapie, la guerre froide a interdit à la médecine des pays d'Europe de l'Est l'accès aux antibiotiques produits par l'industrie pharmaceutique occidentale.

Par décision du gouvernement de l'URSS, les professionnels de la santé et les chercheurs de ces pays ne pouvaient se rendre à l'étranger pour faire état de leur savoir-faire et de leurs découvertes en matière de phagothérapie.

Pour toutes ces raisons, en occident, cette méthode ne pouvait subir d'autre sort que l'oubli.

Cependant, depuis la chute des régimes communistes de l'Est et l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, la phagothérapie bénéficie d'un regain d'intérêt de la part des thérapeutes occidentaux, comme en témoigne la progression du nombre de publications consacrées au bactériophage depuis les années 2000-2011 (Fig. 1).

Biologie des bactériophages

Selon leur cycle biologique, on distingue 2 types de bactériophages : les phages lytiques et les phages tempérés.¹²

Les phages lytiques, comme leur nom l'indique, détruisent la bactérie. Ils détournent la machinerie bactérienne à leur profit pour se reproduire et se multiplier. Au terme du processus appelé cycle lytique, la bactérie éclate et plusieurs dizaines de nouveaux phages - identiques à l'original - sont libérés dans le milieu et donc disponibles pour s'attaquer à d'autres bactéries de la même espèce. Véritables « tueurs professionnels », les phages lytiques sont les prédateurs naturels des bactéries. Ce sont précisément ces phages lytiques et eux seuls qui sont utilisés à des fins thérapeutiques (depuis D'Hérelle) pour lutter contre les infections bactériennes (phagothérapie).

Les phages tempérés sont dotés de la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien. Ce phénomène est appelé transduction et le cycle phagique est dénommé cycle lysogénique les phages peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non (gènes de virulence par ex). Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps - tels des « agents dormants », tapis dans le génome bactérien (on parle alors de prophages) avant d'entamer leur reproduction et d'entrer dans un cycle lytique. Ces phages tempérés ne sont pas utilisés en thérapeutique. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique on doit même s'assurer de l'absence de phage tempéré dans la préparation, car ils sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le malade. En revanche, les phages tempérés sont les auxiliaires précieux des laboratoires de biologie moléculaire, qui les utilisent comme outils pour implanter des gènes à l'intérieur de bactéries afin d'en modifier le génome et permettre (par exemple) la fabrication de molécules par la bactérie, utilisée comme « usine ».

Bactériophages et lyse bactérienne

S'il existe différentes formes de bactériophages, la structure commune est la même.¹³ Elle comporte au minimum : le matériel génétique, en général contenu dans une capsid (ou capsule), un dispositif d'arrimage à la bactérie cible et un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie (Fig 3).

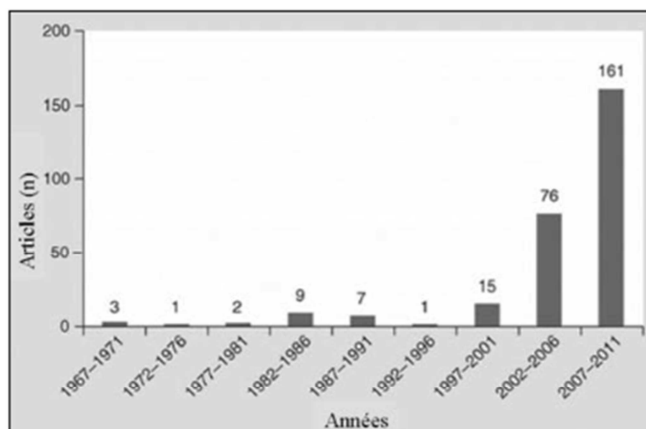


Fig. 1 - Articles consacrés au bactériophage et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011.

Le cycle lytique comporte différentes phases¹⁴ :

i) Arrimage, c'est-à-dire fixation du phage sur la bactérie grâce à des récepteurs spécifiques au phage et à l'espèce bactérienne à laquelle il s'attaque.

ii) Perforation de la paroi et de la membrane bactériennes à l'aide d'enzymes contenues dans le phage

iii) Injection de l'ADN du phage dans le cytoplasme bactérien, le plus souvent à l'aide des molécules contractiles du fourreau, qui se comporte ainsi comme une seringue.

iv) Fragmentation de l'ADN bactérien et utilisation de la machinerie bactérienne pour synthétiser les éléments constitutifs des futurs phages.

v) Maturation et assemblage des différents éléments produits.

vi) Éclatement de la bactérie et libération des phages dans le milieu. Cette opération conduit à la mort bactérienne et à la production de 50 à 100 clones du phage original pour chaque cycle lytique. Le cycle lytique produit ainsi un phénomène d'amplification considérable puisque pour une bactérie attaquée, il y a plus de 50 phages produits. La production totale de phages est, par ailleurs, d'autant plus importante que le nombre de bactéries (inoculum) est élevé.

Le cycle lytique se déroule habituellement en moins de 30 minutes alors que le processus de division bactérienne requiert environ 1 heure. La destruction des populations bactériennes (bactéricidie) est ainsi plus rapide que leurs capacités de renouvellement. Par ailleurs chaque phage est spécifique d'une espèce bactérienne (son système d'arrimage est spécifique, son ADN est probablement lui aussi adapté à l'ADN bactérien qu'il va fragmenter). En revanche, il peut s'attaquer à une ou plusieurs souches dans la même espèce. Cette spécificité d'espèce interdit aux phages de modifier les autres espèces présentes dans le milieu.

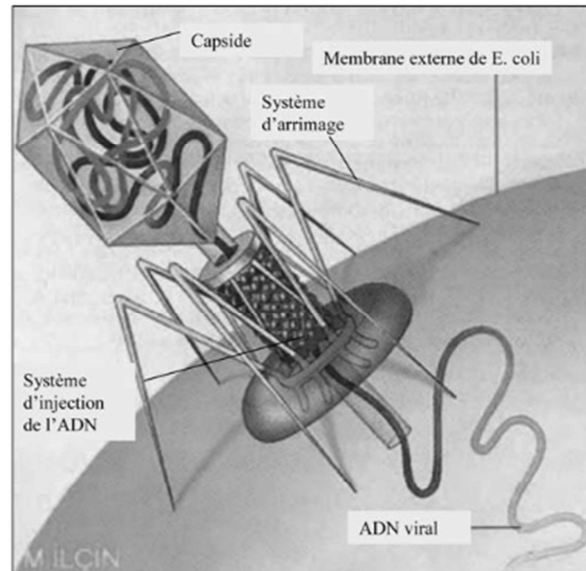


Fig. 3 - Structure du bactériophage T4, spécifique de la bactérie *Escherichia coli*.

Place des phages dans la nature

Les bactériophages, bien que méconnus, représentent la biomasse la plus importante de la planète. Considérant qu'il y en aurait dix à cent fois plus que de bactéries, leur abondance est évaluée à 10^{30} - 10^{32} .¹⁶ Ils seraient apparus sur terre avec les premières bactéries. Leur ancienneté serait ainsi estimée à plusieurs milliards d'années. Ils sont de ce fait soumis à l'influence de l'évolution depuis des temps immémoriaux. Pour toutes ces raisons, on peut considérer que les bactériophages sont parfaitement fonctionnels, et étroitement adaptés aux milieux naturels qui les hébergent. Les phages représentent la forme de vie la plus variée sur terre. Pour chaque bactérie connue, il existe en effet, au moins un phage identifié (en moyenne 10 à 100). On trouve des bactériophages dans tous les écosystèmes, y compris dans des milieux aussi hostiles que les déserts¹⁷ et même dans la neige vierge.¹⁸ L'espèce humaine héberge elle aussi de nombreux phages : peau, muqueuses, et surtout tube digestif, dans lequel on a identifié plus de 100 phages différents.

On sait que les phages lytiques sont directement responsables d'au moins 50% de la mortalité bactérienne journalière en l'absence d'autres prédateurs. Ils contribuent ainsi probablement au renouvellement des populations bactériennes et à leur régulation. Ils contribueraient aussi à la mobilisation de substrats issus de la destruction des bactéries : ils ont donc aussi un rôle à jouer dans le cycle du carbone. Les phages tempérés, quant à eux, contribuent aux échanges de matériel génétique entre bactéries ; ils joueraient ainsi un rôle dans leur évolution. Pour comprendre le rôle que peuvent avoir les bactériophages au sein des milieux naturels, il faut s'intéresser aux travaux de Faruque sur le choléra^{19,20} (Fig. 4). Celui-ci montre que l'apparition et l'arrêt d'une épidémie de choléra correspondent à une modification de l'équilibre entre populations bactériennes (*Vibrio cholerae*) et populations de phages spécifiques.

Les interactions hôtes-bactéries et leur coévolution laissent apparaître la possibilité de résistances des bactéries à l'action des bactériophages et laissent entrevoir une possible inefficacité des phages sur les bactéries. On a pu montrer qu'il était assez facile de produire in-vitro des bactéries résistantes à un phage. En revanche, il est surprenant de constater que ce n'est pas le cas dans la nature.¹⁵ Ce mécanisme n'est pas encore compris mais il est probable que bactériophages et bactéries-hôtes subissent en permanence des mutations qui rendent les résistances labiles. De ce fait, si les bactéries peuvent facilement devenir résistantes aux phages, ceux-ci peuvent à leur tour, par mutation, recouvrer l'efficacité vis-à-vis de leur bactérie cible.

Que deviennent les phages après disparition de leurs bactéries-hôtes ? D'Hérelle avait déjà montré que les phages sont très résistants dans la nature et qu'ils tolèrent des conditions physico-chimiques bien plus difficiles que celles supportées par les bactéries, probablement équivalentes à celles des spores bactériennes.^{21,22} Il est donc probable qu'ils peuvent survivre dans les milieux naturels hors la présence de leur bactérie-hôte, mais leur survie doit avoir des limites, pour l'instant inconnues.

Utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques (phagothérapie)

L'utilisation thérapeutique des bactériophages présente des avantages et des limites. Compte tenu de la rapidité de leur multiplication et du nombre de clones issus de chaque cycle lytique, il est logique d'attendre de la phagothérapie une bactéricidie intense et rapide. Celle-ci est plus rapide que celle obtenue par les antibiotiques. Elle sera d'autant plus importante que les populations bactériennes sont élevées, à la différence des antibiotiques. Du fait de la spécificité des phages pour une espèce bactérienne donnée, la pression de sélection est sans doute réduite et leur impact sur les écosystèmes sera, en principe, limité. Par ailleurs, la résistance bactérienne aux phages est connue comme rare in vivo et surtout particulièrement labile. L'efficacité du produit à usage thérapeutique est ainsi espérée comme stable dans le temps. Dans la mesure où notre organisme héberge des phages, il n'y a pas de raison pour que la tolérance des solutions de phages à usage thérapeutique soit mauvaise, et l'expérience de plus de 80 ans d'utilisation en Géorgie nous renforce dans cette conviction.

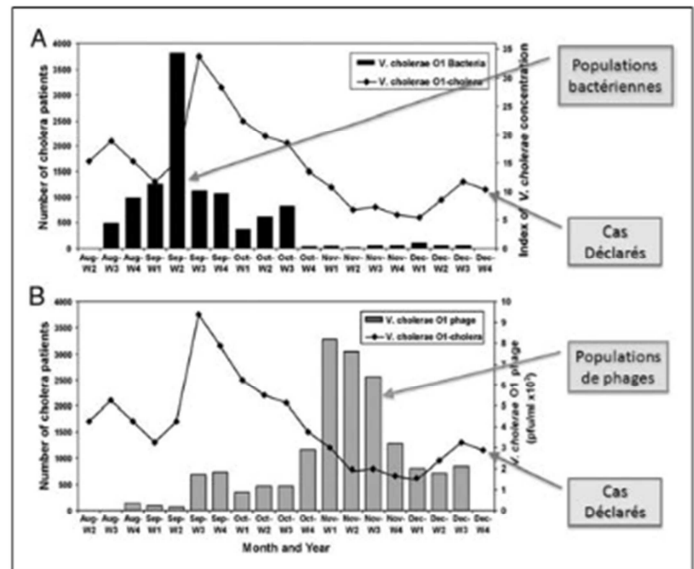


Fig. 4 - Relations phages - bactéries : cas déclarés au cours d'une épidémie de choléra.

Limites de la phagothérapie

- Dans la mesure où leur cible est la bactérie, il ne faut en espérer aucun bénéfice sur les infections fongiques, parasitaires et virales.
- Leur application chez l'homme paraît limitée aux seules infections où le bactériophage peut être amené au contact de la bactérie.²³ Tous ce qui nécessite l'injection de phages (septicémies, infections parenchymateuses) paraît voué à l'échec puisque les phages seront en principe détruits par le système immunitaire. De la même manière il ne faut en attendre aucun bénéfice sur les infections produites par des bactéries intracellulaires (tuberculose, légionellose par ex.).
- Plus préoccupant est l'absence de cadre réglementaire quant à l'usage de la phagothérapie.²⁴ Les bactériophages n'existent pas aux yeux du législateur : ce ne sont ni des médicaments, ni des organes, ni des tissus, ni des vaccins, ni des dispositifs médicaux. Ils ne sont pas reconnus par les autorités de tutelle, et ne seront donc pas remboursés par les assurances de santé. On n'a théoriquement pas le droit de les utiliser....mais rien ne nous interdit de le faire. En revanche, en cas d'incident lié à l'emploi de la phagothérapie, aucune assurance professionnelle ne couvrira le thérapeute puisqu'il n'existe aucun cadre légal à la phagothérapie. La seule option possible dans ce contexte est de l'utiliser sous l'égide de la convention d'Helsinki qui précise qu'en présence d'une situation où toutes les thérapeutiques reconnues ont échoué, le thérapeute est en droit de recourir à l'option thérapeutique qu'il estimera efficace. Pour se procurer des solutions de bactériophages à usage thérapeutique, il n'y a pas d'autre choix que de s'adresser soit aux organismes des pays de l'ex Europe de l'Est (Institut Eliava – Phage Therapy Center - Tbilissi - Géorgie / Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale – Wrocław – Pologne...) soit à produire soit même ces solutions à partir de phages extraits des milieux naturels. En revanche, si la première solution paraît la plus simple, sa mise en œuvre n'est pas facile car il est difficile de faire franchir les frontières à des virus – à fortiori des bactériophages qui n'ont aucune existence légale – sans tomber sous le coup des lois sur le bioterrorisme.
- Les solutions à usage thérapeutique peuvent théoriquement constituer un vecteur potentiel de gènes. Ces solutions à usage thérapeutique ne doivent en effet contenir que des phages lytiques et jamais de phages tempérés. Il est vraisemblablement prudent de n'utiliser, à des fins thérapeutiques, que des phages naturels et d'éviter de tenter d'utiliser des phages génétiquement modifiés (si tant est qu'il en existe).
- Dans la mesure où les produits destinés à la phagothérapie ne contiennent que des phages naturels, ceux-ci seront impossibles à protéger par un brevet, puisqu'inventés par la nature. Pour une firme pharmaceutique ou une société commerciale, le retour sur investissement est sans doute difficilement garanti.

Facteurs-clé de succès

- Pour se prémunir contre l'apparition de résistances²³ (même si celles-ci ne semblent pas aussi problématiques qu'avec les antibiotiques) et garantir une efficacité thérapeutique optimale, il est recommandé que le produit contienne au moins 3 phages différents actifs sur la souche bactérienne à traiter. Le titre de la solution doit également s'avérer suffisant, c'est-à-dire dépasser le seuil de 10^5 PFU/ml (PFU = phages formant unité).
- Les préparations à usage thérapeutique doivent respecter un certain nombre de bonnes pratiques (bonnes pratiques de laboratoire, bonnes pratiques pharmaceutiques) et notamment ne contenir ni pyrogènes, ni cytokines, ni endotoxines... ni phages tempérés.
- Les phages doivent être administrés au contact de la bactérie (application directe, pulvérisation, aérosols...). Pour les produits destinés à traiter les infections bactériennes du tube digestif, il faut ainsi préserver le produit du contact avec le pH acide de l'estomac et donc soit modifier le pH gastrique, soit utiliser des vecteurs qui ne libèrent les phages qu'après le passage de la cavité gastrique.

Aspects pratiques

Préparation des phages

La préparation des bactériophages est un procédé techniquement simple, c'est-à-dire à la portée de pays à bas niveau de vie.²⁵ Les bactériophages sont issus d'eau « sale », qu'il faut centrifuger, décanter puis passer sur un filtre qui retient les bactéries. Il convient de mettre le filtrat en présence d'un bouillon de culture de la bactérie pathogène que l'on souhaite traiter. Il suffit de quelques heures d'incubation à 35°C sous agitation douce pour produire des phages thérapeutiques en quantité suffisante. A l'issue du processus, il suffit d'ajouter quelques gouttes de chloroforme pour détruire les bactéries résiduelles sans détruire les phages, puis centrifuger et filtrer de nouveau pour éliminer les débris bactériens. La solution obtenue contiendra ainsi un ou plusieurs phages actifs sur la bactérie cible, et en quantité suffisante. On pourra en vérifier l'efficacité en déposant une goutte de la préparation sur une gélose contenant un « tapis » de la bactérie à traiter. La présence d'une plage claire à l'endroit du dépôt signe la lyse bactérienne. Il est même possible d'aller plus loin dans la préparation et d'obtenir des solutions pures d'un clone à partir d'une plage de lyse.

Bactériophages vs antibiotiques

Les antibiotiques sont irremplaçables dans certaines situations (infections à germes intracellulaires / infections parenchymateuses). Les phages semblent indispensables dans d'autres situations (infections à bactéries multirésistantes aux antibiotiques). De plus, il y aurait avantage à utiliser phages et antibiotiques concomitamment, car le bactériophage réduit l'inoculum bactérien ce qui permet à l'antibiotique d'agir plus efficacement et probablement avec une pression de sélection réduite (moindre probabilité d'apparition de résistances puisque l'inoculum bactérien est plus faible). De plus, l'utilisation des bactériophages va s'accompagner d'un moindre recours aux antibiotiques. Dans la mesure où c'est précisément l'utilisation des antibiotiques qui fait le lit des résistances bactériennes, l'utilisation de la phagothérapie doit permettre de réduire les résistances bactériennes aux antibiotiques. On le voit, il y a un bénéfice à utiliser antibiotiques et bactériophages non seulement pour leur effets synergiques mais aussi parce que tant les antibiotiques que les bactériophages sont irremplaçables dans certaines situations. Antibiotiques et bactériophages ne sont donc pas concurrents mais bien complémentaires et la phagothérapie doit être envisagée comme une arme supplémentaire dans l'arsenal de la lutte contre les infections bactériennes.

Usages non médicaux ou non thérapeutiques

Les bactériophages sont d'ores et déjà utilisés dans l'industrie alimentaire²⁶ : la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé depuis plusieurs années la mise sur le marché d'une préparation commerciale (Listex®) destinée à éradiquer l'espèce *Listeria* dans les fabrications issues de l'industrie laitière. Il a aussi été imaginé un usage agroalimentaire à plus grande échelle et notamment en aquaculture pour réduire l'usage intensif des antibiotiques.

Une préparation à *usage vétérinaire* est encore disponible aux USA.

En Géorgie, des solutions de bactériophages sont utilisées en pulvérisation cutanée dans le cadre de l'*asepsie* préopératoire.

On peut également voir dans le bactériophage un moyen intéressant de *décontamination du tube digestif* permettant ainsi de se débarrasser du portage intestinal de BMR (bactéries multirésistantes), chose impossible jusqu'alors. Ceci ouvre des perspectives très intéressantes : réduction de la morbi-mortalité associée au portage de BMR, réduction de la charge en soins résultant de la mise en place de mesures d'hygiène renforcées (personnel dédié, isolement, habillement), réduction des coûts.

On peut aussi envisager *l'utilisation du bactériophage à des fins diagnostiques*. En effet, en testant différentes souches de bactériophages connus sur une bactérie inconnue, on peut identifier non seulement l'espèce bactérienne, mais aussi la souche et disposer d'un moyen thérapeutique efficace (le bactériophage). Dans la mesure où le bactériophage est très rapidement bactéricide, on peut imaginer qu'une telle méthode permettrait d'identifier la bactérie beaucoup plus rapidement qu'avec les méthodes conventionnelles.

Ce ne sont ici que quelques possibilités imaginées au vu des connaissances actuelles sur le bactériophage. Nul doute que l'arrivée de la phagothérapie et la progression des connaissances vont ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. D'Hérelle F : Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 165: 373-5, 1917. □
2. Dublanquet A : Découverte des virus et bactériophages. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 55- 8, Favre Ed, 2009. □
3. D'Hérelle F : Sur le microbe bactériophage. *Comptes rendus de la Société de Biologie*. 82: 1237, 1919. □
4. D'Hérelle F : Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 167: 970-2, 1918. □
5. Dublanquet A : Premiers traitements. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 108-9, Favre Ed, 2009. □
6. D'Hérelle F : Essai de traitement de la peste bubonique par le □bactériophage. *La Presse Médicale*, 33: 1393, 1925. □
7. Morison J: Bacteriophage in cholera. *Transactions of the Royal □Society of Tropical Medicine*, 28: 563, 1935. □
8. Dublanquet A : Extension mondiale. In : Dublanquet A (ed) : « Des □virus pour combattre les infections », 110-5, Favre Ed, 2009. □
9. Dublanquet A : Dix années de polémique. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 115-21, Favre Ed, □2009. □
10. Dublanquet A, Fruciano E : Brève histoire de la phagothérapie. □*Med Mal Infect*, 38: 415-20, 2008. □
11. Pirnay JP, Verbeken G, Rose T, Jennes S, Zizi M, Huys I et al.: □Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future □Virology*, 7: 379-90, 2012. □
12. Dublanquet A : Reproduction et propagation. In : Dublanquet A □(ed) : « Des virus pour combattre les infections », 69-73, Favre □Ed, 2009. □
13. Dublanquet A : Morphologie et classification. In : Dublanquet A □(ed) : « Des virus pour combattre les infections », 60-4, Favre Ed, □2009. □
14. Dublanquet A : Cycle phagique. In : Dublanquet A (ed) : « Des □virus pour combattre les infections », 73-7, Favre Ed, 2009. □
15. Dublanquet A : Habitat naturel des bactériophages. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 77-82, Favre Ed 2009. □
16. Weinbauer MG: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 127-81, 2004. □
17. Souza V, Espinoza-Asuar L, Escalante A, Eguiarte L, Farmer J, Forney L et al.: An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 6565-70, 2006. □
18. Arloing F, Chavanne F : Propriétés empêchantes des eaux de l'Isère à l'égard de diverses cultures microbiennes. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 92: 257, 1925. □
19. Faruque S, Naser I, Islam M, Faruque A, Gosh A, Nair G et al. : Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 1702-7, 2005. □
20. Faruque S, Islam M, Ahmad Q, Faruque A, Sack D, Nair G et al.: Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6119-24, 2005. □
21. Dublanquet A : Survie des bactériophages dans la nature. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 84- 5, Favre Ed, 2009. □
22. D'Hérelle F : Le bactériophage et son comportement. Masson Ed, 1926. □
23. Dublanquet A : Apparition des antibiotiques. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », 125-32, Favre Ed, 2009. □
24. Verbeken G, De Vos D, Vaneechoutte M, Merabashvili M, Zizi M, Pirnay JP : European regulatory conundrum of phage therapy. *Future Microbiology*, 2: 485-91, 2007. □
25. Dublanquet A : Préparer des suspensions à usage thérapeutique. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », Favre Ed, 86-94, 2009. □
26. Dublanquet A : Phagothérapie classique avec des phages naturels. In : Dublanquet A (ed) : « Des virus pour combattre les infections », Favre Ed, 144-50, 200