

LISTE DES ABREVIATIONS

attB : site d'attachement présent sur l'ADN bactérien

attP : site d'attachement présent sur l'ADN phagique

bio : biotine

CDR : complementary determining region

dsDNA: ADN double brin

gal: galactose

GISA: Staphylocoques Aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides

ICTV : Comité International de Taxonomie des virus

IM : Inner Membrane=Membrane interne

Kbp : Kilo paire de base

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OM : Outer Membrane=Membrane externe

PCR : polymerase chain reaction

PG : peptidoglycane

SARM: Staphylocoque Aureus résistant à la méthycilline

SOS : Save Our Souls

ssDNA : ADN simple brin

ssRNA : ARN simple brin

VH : Domaine variable de la chaîne lourde

VL : Domaine variable de la chaîne légère

LISTE DES SYMBOLES

λ : Lambda

ϕ : Phi

ψ : Psi

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des bactériophages 17

Tableau 2 : Les signes distinctifs des genres Myoviridae 19

Tableau 3 : Les signes distinctifs des genres Siphoviridae 20

Tableau 4 : Les signes distinctifs des genres Podoviridae..... 20

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schémas illustrant la morphologie et les différentes protéines structurales composant : le phage T4, le phage T7 et le phage SPP1. Image prise en coloration négative du phage λ illustrant les différentes parties le constituant notamment sa queue 11

Figure 2:Processus d'infection du phage T4 14

Figure 3 : Morphologie des principaux groupes de bactériophages 16

Figure 4 : culture de *Staphylococcus aureus* 21

Figure 5 : Cycle lytique d'un bactériophage..... 25

Figure 6 : Les phages T4 adsorbés à la surface d'*Escherichia coli*, vus au microscope électronique..... 27

Figure 7. Schéma général des différentes étapes dans l'assemblage des capsides des phages de la famille des Caudovirales 30

Figure 8 : Schéma général du cycle de vie du bactériophage tempéré λ 37

Figure 9 : action locale d'un polymère biodégradable imprimé de bactériophages sous le nom « phagobioderm ».....	55
Figure 10 : photos représentant l'efficacité d'intervention de la phagothérapie associée à l'antibiothérapie dans le traitement d'une ostéite chronique du pied	61
Figure 11 : Sélection de phages-substrats	68
Figure 12 : Production d'anticorps.....	70

SOMMAIRE

I-INTRODUCTION	1
II-HISTORIQUE.....	4
II.1. La découverte des bactériophages	5
II.2. La naissance de la phagothérapie	6
II.3. Enthousiasme et désenchantement	7
II.4. Déclin de la phagothérapie	9
II.5. Un espoir pour une réutilisation de la phagothérapie	9
III-Caractéristiques des bactériophages	10
III.1. Structure et morphologie	11
a- La tête.....	12
b- Le col	12
c- La queue	13
III.2. Classification	16
III.3. Mise en évidence et numération des bactériophages.....	21
IV-Pouvoir pathogène des bactériophages.....	23
IV.1. Fonctionnement d'un bactériophage	24
IV.2. L'infection lytique, les phages virulents	25
a- L'adsorption spécifique	26
b- Pénétration (injection) du génome phagique dans la bactérie	27
c- L'expression du génome viral	28

d- L'Assemblage des progénitures du phage	29
d.1. La tête	29
d.1.1. La formation d'un précurseur : la procapside.....	30
d.1.2. Clivage protéolytique	31
d.1.3. L'expansion : transition procapside– capside	32
d.1.4. La stabilisation	32
d.2. La queue	33
d.3. Les fibres	34
e- La lyse de la bactérie.....	34
IV.3. L'infection non lytique, les phages tempérés	35
IV.4. Modification de la pathogénie des bactéries par les bactériophage... .	40
V-Avantages et inconvénients de la phagothérapie	41
V.1. Les avantages de la phagothérapie	42
V.2. Les inconvénients de la phagothérapie.....	43
VI-Nouveaux arguments en faveur de la thérapie par les phages.....	46
VI.1. Premier argument : interactions phages—antibio	47
VI.2. Deuxième argument : biofilms et bactéries persistant	50
VI.3. Troisième argument : inhibition du système SOS bactérien	51
VII-Les applications médicales de la phagothérapie	52
VII.1. Phagoprophylaxie.....	53
VII.2. Thérapie par les phages	53
a) Anciennes applications	53

b) Nouvelles tentatives	56
VII.3. Traitement de certaines maladies infectieuses	57
a) Traitement des infections à Escherichia coli	57
b) Traitement des infections à Staphylococcus aureus	59
c) Traitement des infections à Pseudomonas aeruginosa	63
d) Traitement des infections à Mycobacterium tuberculosis	64
e) Traitement des infections à Clostridium difficile et Bacillus anthracis..	65
VII.4. Biotechnologie: les multiples applications du phage display	67
VII. 4.1. Sélection de phages-substrats.....	67
VII. 4.2. Immunisation	69
VII. 4.3. Les banques combinatoires d'anticorps.....	69
Conclusion	73

INTRODUCTION

Depuis la création des antibiotiques, les bactéries n'ont cessé de développer des résistances au point de devenir aujourd'hui une véritable menace pour l'Homme. Alors que 52 millions de personnes dans le monde seraient porteuses de staphylocoques résistants aux antibiotiques [1], les autorités peinent à trouver une solution viable. Entre les industries pharmaceutiques qui se refusent à de coûteuses recherches en ce qui concerne les antibiotiques et la surconsommation de ces derniers dans le monde, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les bactéries s'amenuise.

De plus, aujourd'hui, pour diverses raisons, le développement de nouvelles molécules est quasi inexistant à tel point que certains n'hésitent pas à évoquer la fin d'une période et annoncent une ère « post antibiotique » [2].

C'est pourquoi on peut se poser la question de savoir s'il existe une alternative à ce problème. C'est là qu'entrent en jeu les bactériophages (ou simplement phages), qui sont les virus naturels des bactéries (littéralement: mangeurs de bactéries), ils reconnaissent, parasitent et tuent spécifiquement, pour la plupart d'entre eux, et pour chaque phage au moins une bactérie. En revanche, ils sont incapables d'infecter les cellules végétales ou animales [3].

D'où l'idée de nous pencher sur la question suivante: ***est-ce que les bactériophages pourraient résoudre le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques et ainsi constituer une possibilité de leur remplacement ?***

Ainsi, redécouvrir **la phagothérapie** : qui est l'utilisation de phages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne, et qui a longtemps été négligée par les pays occidentaux grâce au succès des antibiotiques, tandis qu'elle est toujours employée et développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique.

L'intérêt de cette thérapie réside dans divers domaines parmi eux :

- Le traitement des maladies infectieuses chez l'homme
- La génétique
- La biologie moléculaire
- L'identification et typage des bactériophages

Les objectifs de notre thèse sont :

- Connaître les caractéristiques des bactériophages
- Expliquer le mécanisme du principe lytique des bactériophages
- Montrer les nouveaux arguments en faveur d'une réhabilitation de la phagothérapie
- S'arrêter aux applications médicales des bactériophages

Historique

II.1. La découverte des bactériophages

L'histoire des phages a 94 ans. Aujourd'hui, il est admis que la découverte du bactériophage appartient conjointement à deux microbiologistes :

- **Frederick william Twort** : bactériologiste anglais qui a la propriété de la description du principe lytique sur des colonies de *Micrococcus*, en **1915**, il est donc indubitable qu'il avait fait une interprétation imprécise et, surtout, n'avait pas poursuivi ses recherches et encore moins envisagé une utilisation thérapeutique. Il n'est donc pas contestable que le mérite de la phagothérapie appartient à Félix d'Hérelle [4].

- **Félix d'Hérelle** : biologiste canadien d'origine française, qui a pressenti très tôt le rapport entre un phénomène observé au laboratoire et le phénomène de la guérison clinique en **1917**. Pour lui, l'apparition de plages claires, observée dans les boîtes de Petri sur lesquelles cultivaient les bactéries responsables de dysenterie bacillaire, semblait annoncer la guérison. En effet, dès le **9 décembre 1918**, d'Hérelle après avoir constaté que « la pathogénie et la pathologie de la dysenterie bacillaire sont dominées par deux facteurs agissant en sens contraire : le bacille dysentérique, agent pathogène et le microbe filtrant bactériophage, agent d'immunité », affirma que c'est « logique de proposer comme traitement de la dysenterie bacillaire l'administration, dès l'apparition des premiers symptômes, de cultures actives du microbe bactériophage » [5]. Il eut à s'intéresser à une épizootie de typhose aviaire [6] qui sévissait en France. Il profita de cette occasion pour généraliser ses conclusions quant à l'histoire naturelle de la guérison par le bactériophage. Il alla plus loin encore affirmant dès ce moment que « l'immunité est contagieuse au même titre que la maladie elle-même. Il résulte également des faits énoncés que l'ingestion d'une culture

du microbe bactériophage provenant d'une souche douée d'une virulence exaltée pour le bacille pathogène doit être de nature à conférer l'immunité ». D'Herelle a isolé du bactériophage actif contre différentes espèces de bacilles (outre les précédents, *Escherichia coli*, *Proteus*, plusieurs *Salmonella*) [7].

Il a démontré avec beaucoup d'assurance qu'il s'agissait d'un « microbe » et non pas d'une « diastase ». Le principal critère démontrant la nature virale du phénomène étant l'apparition de plages claires sur les boîtes de Petri.

En effet, il existe des milliers de bactériophages différents par leur morphologie et leur spécificité et qu'à chaque espèce bactérienne correspond au moins un phage.

D'Hérelle ne se doute pas de la découverte qui lui aurait valu le Prix Nobel si les phages n'avaient pas été observés deux ans auparavant par Twort. Ses observations sont alors présentées devant les membres de l'Institut Pasteur. Il poursuit ses recherches dans ce domaine ce qui lui vaut rapidement une certaine renommée. L'Université de Montréal lui attribue même un doctorat honoris causa [8].

II.2. La naissance de la phagothérapie

D'Herelle a relaté ses toutes premières tentatives de «phagothérapie» chez des enfants à l'hôpital Necker–Enfants Malades dans le service du Pr Hutinel au cours de l'été **1919**, non sans avoir préalablement absorbé et fait absorber « son » bactériophage à son entourage pour en vérifier l'innocuité. Cinq enfants atteints de dysenterie bacillaire furent traités avec succès.

Dès lors, de nombreux autres travaux furent entrepris. Le Japonais **Kabeshima**, tout en contestant la nature même du bactériophage, par l'injection

intraveineuse d'un « bactériolysat du bacille de Shiga », éliminera le bacille vivant de la bile de lapins [9].

Dès le début de l'année **1920**, kabeshima, tentera de faire la démonstration de la nature chimique du bactériolysat, qu'il appellera *ferment*[10;11].

D'Herelle s'était embarqué pour l'Indochine. Il avait rencontré Yersin, de passage à Paris, qui lui avait proposé d'étudier les possibilités d'un traitement de la peste bovine.

Au cours de son séjour en Extrême Orient, d'Herelle généralisa chez l'animal le rôle du bactériophage en tant qu'agent de guérison, non seulement dans la peste du buffle, mais aussi la peste chez le rat et la flacherie -maladie mortelle causée par l'ingestion de feuilles de mûrier infectées- chez le ver à soie « Il n'avait eu, jusqu'ici, l'opportunité de rechercher le microbe bactériophage que dans des maladies présentant des manifestations intestinales : dysenteries bacillaires, fièvres entériques, typhose aviaire ; dans toutes ces maladies, il avait réussi à isoler un microbe bactériophage actif contre la bactérie pathogène.

Il était intéressant de vérifier si le fait restait limité aux maladies intestinales ou s'il s'agissait d'un phénomène général de défense ». [2]

En **1927** D'Hérelle Collabore avec le Service médical indien pour la prophylaxie du choléra par le traitement par bactériophages [12].

II.3. Enthousiasme et désenchantement

La phagothérapie semblait pouvoir être généralisée à un grand nombre d'infections jusque-là souvent mortelles. C'est ainsi qu'apparut la commercialisation de préparations à usage thérapeutique. Le principal germe concerné était le *staphylocoque*, mais de nombreuses maladies infectieuses

cutanées, intestinales, génitales, respiratoires étaient traitées. Les résultats de la phagothérapie souvent rapportés dans la presse scientifique, et même les quotidiens et revues « grand public », éveillèrent l'attention de plusieurs entreprises pharmaceutiques importantes : *Parke-Davis*, *Eli Lilly*, *Abbott et Squibb* aux États-Unis ou plus modestes en Allemagne et en Angleterre.

En France, les laboratoires *Robert et Carrière*, proposèrent à d'Herelle d'installer en **1928** *le laboratoire du bactériophage*. La firme se réservait l'exclusivité de la commercialisation pour la France. Les cinq spécialités à base de phages (**bacté-intesti-phage**; **bacté-coli-phage**; **bactérhino-phage**; **bacté-pyo-phage** ; **bacté-staphy-phage**) auront été pendant les années **1930** parmi les dix meilleures ventes des médicaments de l'entreprise [13]. Une monographie a fait la synthèse des possibilités thérapeutiques connues [14;15] à cette époque.

En **1934**, D'Hérelle reçoit une offre étonnante : Staline lui propose de venir créer un institut sur les bactériophages dans sa contrée d'origine, la Géorgie. Socialiste à ses heures, D'Hérelle accepte et fonde avec son ami géorgien Georges Éliava un institut qui porte le nom de ce dernier [16].

Les Allemands, quant à eux, se sont immédiatement engagés dans la production à grande échelle dès le début de la seconde guerre mondiale pour traiter la dysenterie bactérienne. Il y a peu de données concernant l'utilisation et l'intérêt de cette pratique pendant le conflit. L'analyse de suspensions de phages saisies sur des prisonniers allemands ne donna pas une impression très positive [2].

II.4. Déclin de la phagothérapie

La première découverte des antibiotiques en **1945** et leur développement avaient suscité un grand espoir dans la lutte contre les infections bactériennes.

Après la seconde guerre mondiale, ce traitement fut progressivement abandonné par les pays occidentaux au bénéfice de **la pénicilline** et du développement des antibiotiques durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle.

La phagothérapie fut rapidement marginalisée, puis éliminée de la pratique occidentale alors qu'elle a continué d'être utilisée à grande échelle dans les pays de l'Europe de l'Est [2].

II.5. Un espoir pour une réutilisation de la phagothérapie

En**1980**, le biochimiste britannique **Frederick Sanger** reçut le prix Nobel pour avoir réussi à séquencer l'ADN en utilisant un phage. Et donc considéré les bactériophages comme un outil fondamental de recherches ainsi ont permis à l'essor de la biologie moléculaire.

Les connaissances acquises, tant au laboratoire que dans la nature, sur les phages eux-mêmes et la relation avec leurs hôtes sont aujourd'hui très nombreuses. Toutes les données accumulées depuis des décennies assurent une meilleure approche et donnent l'opportunité de revoir la phagothérapie dans des conditions satisfaisantes [17].

Caractéristiques des bactériophages

III.1. Structure et morphologie

Le développement considérable des recherches sur la structure des bactériophages a conduit à la description de nombreuses variétés morphologiques et à l'élaboration d'une véritable anatomie ultra-structurale de ces virus [18].

A ce jour, plusieurs milliers (environ 6000) de phages ont été décrits mais on estime que seulement 10% d'entre eux ont été découverts [19]. (Figure 1)

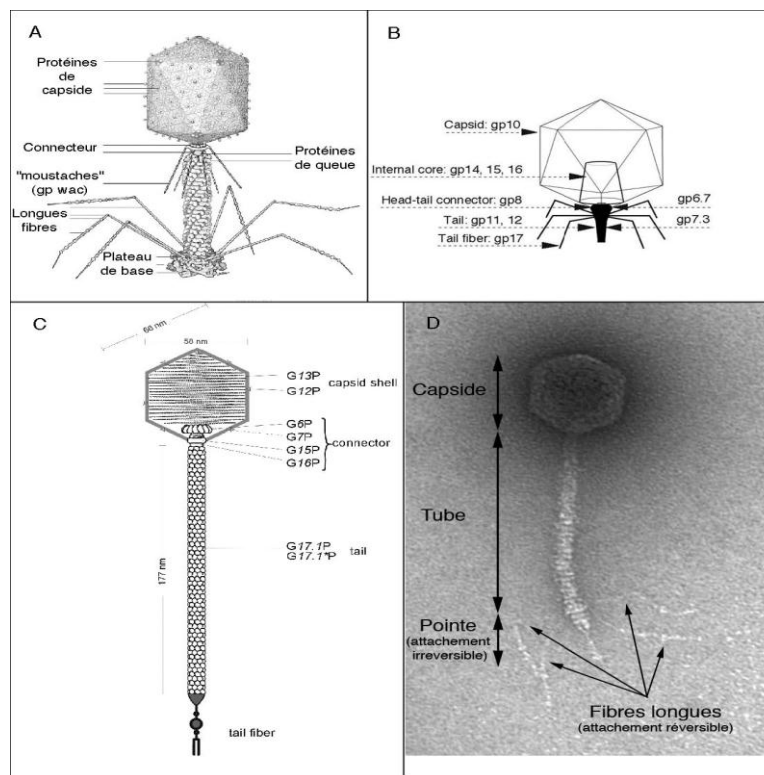


Figure 1 : Schémas illustrant la morphologie et les différentes protéines structurales composant : (A)→ le phage T4 (Myoviridae, queue contractile), (B)→le phage T7 (Podoviridae, queue courte) et (C)→le phage SPP1 (Siphoviridae, queue non contractile). (D)→ Image prise en coloration négative du phage λ (Siphoviridae, queue non contractile) illustrant les différentes parties le constituant notamment sa queue [20].

a- La tête :

La tête du bactériophage a généralement une structure icosaédrique qui est constituée par un noyau très compact d'acide nucléique, entouré d'un enduit protéinique ou capside. La capside est uniquement constituée de protéines dont l'ensemble forme une enveloppe contenant et protégeant le génome viral (ADN ou ARN, en simple ou en double brin).

D'une manière similaire à l'ensemble des virus, la capside des phages à queue est constituée par la répétition d'une protéine ou plusieurs protéines de capside s'arrangeant suivant une symétrie icosaédrique [21;22].

En cela, les phages à queue se distinguent des autres familles de bactériophages qui possèdent certains membres ayant des capsides plus complexes constituées par plusieurs couches protéiques et/ou des membranes lipidiques [23], ces dernières, assimilées à l'enveloppe d'un virus nu, sont responsables de la sensibilité de ces phages « lipidiques » à l'activité des solvants organiques [18]. Les capsides à symétrie icosaédrique, constituées par de multiples copies de la même protéine, sont une solution économique d'un point de vue génétique pour contenir et transporter un génome viral [24], et sont très répandues en virologie [25].

b- Le col :

La capside est amorcée par un connecteur qui est un complexe multi-protéique situé à l'un des sommets de la capside, le connecteur est à la fois en interaction avec elle, mais aussi avec l'ADN et les éventuelles protéines internes ainsi qu'avec la queue du phage [26]. Le connecteur est l'élément central de la machinerie servant à l'incorporation de l'ADN viral dans la capside lors de la

réplication des phages dans la bactérie. Et c'est aussi en passant par le connecteur puis la queue que l'ADN viral est injecté dans le cytoplasme de la bactérie [27]. Le composant principal du connecteur est la protéine portail à laquelle s'ajoutent d'autres protéines de compléments suivant les phages. La structure atomique du connecteur du phage $\Phi 29$ montre que cette protéine s'assemble sous la forme d'un dodécamère ayant un canal central de 35Å suffisamment large pour le passage d'un double brin d'ADN [28;29].

Bien que différente du point de vue de leur séquence primaire, la structure du connecteur de plusieurs phages à queue (T3, T7, P22, SPP1) par cryomicroscopie électronique suggère une architecture commune à celle du phage $\Phi 29$ pour ce composant essentiel dans l'assemblage des virions et dans l'infection de nouvelles bactéries [30-32].

c- La queue :

La queue est un complexe multi-protéique assemblé indépendamment de la capside et du connecteur. L'ancrage de la queue sur la capside au niveau du connecteur termine le cycle d'assemblage des bactériophages. La queue des phages est impliquée dans la reconnaissance et l'attachement aux bactéries hôtes, dans le transperçement des membranes bactériennes ainsi que dans le transfert de l'ADN viral de la capside dans le cytoplasme [33]. **(Figure 2)**

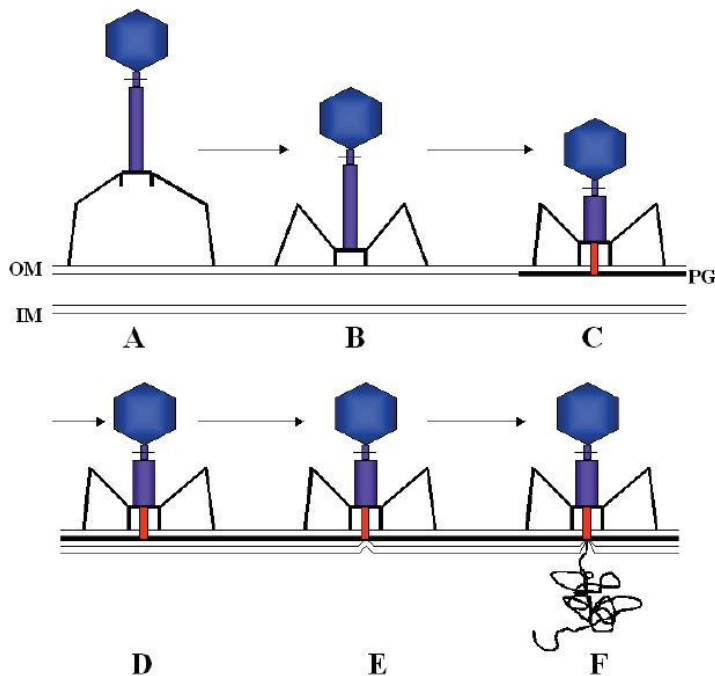


Figure 2:Processus d'infection du phage T4. (A)➔ Attachement des fibres longues à la surface bactérienne. (B)➔ Le phage T4 attache le plateau de base à la surface cellulaire. (C)➔ Contraction de la queue entrainant le tube interne jusqu'au peptidoglycane. (D)➔ Activation du lysozyme. (E)➔ Le lysozyme crée une ouverture dans la couche du peptidoglycane et la membrane interne de la bactérie. (F)➔ Injection et libération d'ADN dans le cytoplasme bactérien [34].

L'analyse de la structure de plusieurs queues de phage a montré que la partie se fixant au connecteur forme, chez les Siphoviridae et les Myoviridae, un tube à symétrie hélicoïdale se terminant par une structure distale contenant les fibres responsables de l'attachement à la surface de bactéries ainsi que les protéines impliquées dans le transperçement des membranes bactériennes [35;36].

Suivant le type de sous famille (Siphoviridae, Myoviridae ou Podoviridae), les mécanismes de transperçement des parois bactériennes et de transferts de l'ADN sont distincts. Le phage T4 (Myoviridae) possède une queue contractile constituée d'approximativement 20 protéines différentes. Ce type de queue contractile fait penser à une seringue de par leur mode d'injection de l'ADN. La fixation de manière irréversible à la surface d'*E. Coli* des fibres courtes situées à l'extrémité de la queue induit une réaction en chaîne entraînant un changement de conformation du plateau de base d'une forme hexagonale vers une forme en étoile [37].

La contraction de la gaine externe de la queue commence alors et entraîne le tube interne, rigide jusqu'à la surface bactérienne [38]. Ensuite, ce tube passe au travers des différentes couches composant la paroi des bactéries sous l'action d'un complexe protéique constituant « l'aiguille » de la seringue [39]. Pour les queues courtes caractéristiques des Podoviridae, la formation du canal au travers des membranes bactériennes est initiée, chez le phage T7, par l'éjection de plusieurs protéines mineures contenues dans l'icapside et possédant une activité enzymatique [40].

Chez le phage T5 appartenant à la sous famille des Siphoviridae, la paroi bactérienne est traversée par la pointe de la queue (pb2) au voisinage du récepteur du phage, FhuA, créant ainsi le passage pour l'ADN viral [41].

Un scénario possible est qu'une fois les membranes transpercées par pb2, l'interaction de pb5 avec FhuA est stériquement possible déclenchant par la suite une réaction en chaîne provoquant l'ouverture du connecteur.

Pour les phages qui n'ont pas de queue, 57% ont une morphologie polyédrique, 35% filamenteuse et 8% pléomorphique. On ne cite qu'un petit

nombre de phages avec cette dernière morphologie contenant des génomes d'ADN double brin.

III.2. Classification

Les bactériophages constituent l'un des groupes d'organismes les plus abondants dans la biosphère. Ils jouissent d'une très grande biodiversité. Nos connaissances partielles de ces micro-organismes sont sans cesse remises en cause par de nouvelles découvertes et le recensement est loin d'être terminé.

Un système de classification de phages a été élaboré par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) au cours des dernières décennies.

La classification actuelle est basée sur leur morphologie et la nature de leur acide nucléique (**Figure 3**).

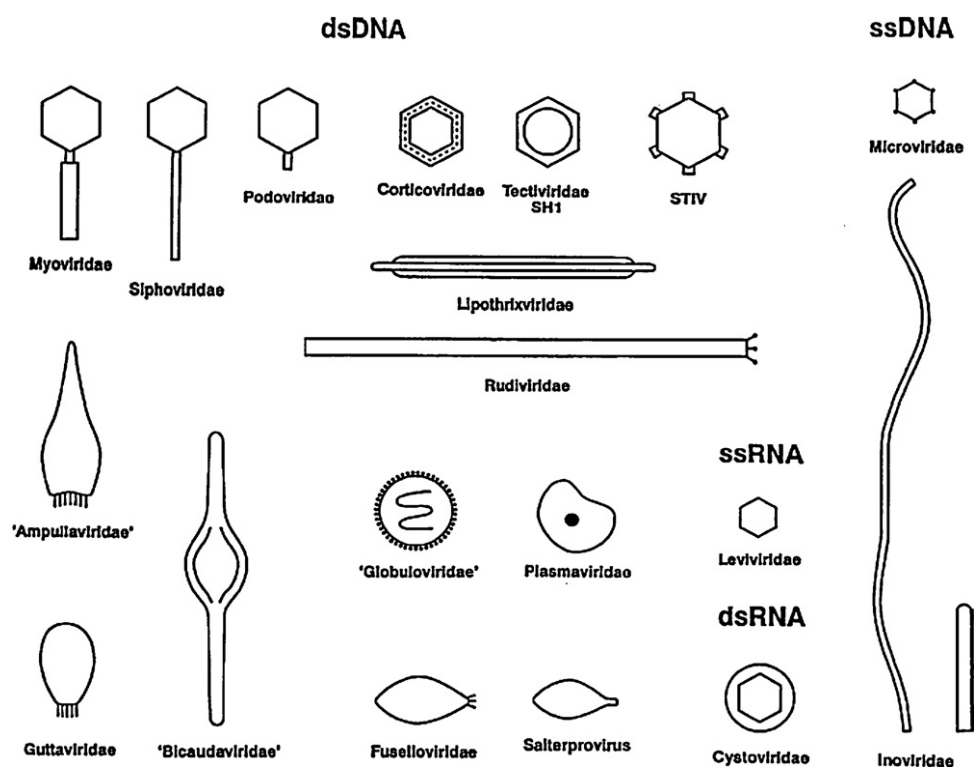


Figure 3 : Morphologie des principaux groupes de bactériophages [42].

Comme tous les virus, les phages sont classés en fonction de la nature de leur acide nucléique et de leur structure (type de symétrie, présence ou absence d'une enveloppe).

L'ICTV établit l'ordre *descaudovirales* (phages à queue), comprenant les 3 familles: les familles MYOVIRIDAE (virus avec queue contractile), SIPHOVIRIDAE (virus à longue queue non contractile) et PODOVIRIDAE (virus à queue courte non contractile).

Au début de 2005, les phages sont classés en **14 familles** et un genre non classé (Tableau1).

Tableau 1:Classification des bactériophages

Famille	Genre	Espèce	Description
<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like viruses</i> <i>P1-like viruses</i> <i>P2-like viruses</i> <i>Mu-like viruses</i> <i>SP01-like viruses</i> <i>ΦH-like viruses</i>	<i>coliphage T4</i> <i>coliphage P1</i> <i>coliphage P2</i> <i>coliphage Mu</i> <i>Bacillus phage SP01</i> <i>Halobacterium phage Φ H</i>	Queue longue contractile, génome linéaire dsDNA
<i>Siphoviridae</i>	<i>like viruses</i> <i>T1-like virus</i> <i>T5-like viruses</i> <i>L5-like viruses</i> <i>c2-like viruses</i> <i>ΨM1-like viruses</i>	<i>coliphage λ</i> <i>coliphage T1</i> <i>coliphage T5</i> <i>Mycobacterium phage L5</i> <i>Lactococcus phage c2</i> <i>Methanobacterium phage ΨM1</i>	Queue longue non contractile, genome linéaire dsDNA
<i>Podoviridae</i>	<i>T7-like viruses</i> <i>P22-like viruses</i> <i>Φ29-like viruses</i>	<i>coliphage T7</i> <i>enterobacteria phage P22</i> <i>Bacillus phage Φ29</i>	Queue courte, non contractile génome linéaire dsDNA
<i>Plasmaviridae</i>	<i>Plasmavirus</i>	<i>Acholeplasma phage L2</i>	Enveloppé, pléomorphe, génome linéaire dsDNA

<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Lipothrixvirus</i>	<i>Thermoproteus virus TTV1</i>	Enveloppé, forme bâtonnet, génome linéaire dsDNA
<i>Rudiviridae</i>	<i>Rudivirus</i>	<i>Thermoproteus virus TTV4</i>	Non enveloppé, en forme bâtonnet, génome linéaire dsDNA
<i>Fuselloviridae</i>	<i>Fusellovirus</i>	<i>Sulfolobus virus SSV1</i>	Non enveloppé, en forme de citron, génome circulaire dsDNA
---	<i>Genre non classé SNDV</i>	<i>Sulfolobus virus SNDV</i>	En forme de gouttelette, génome circulaire dsDNA
<i>Inoviridae</i>	<i>Inovirus</i> <i>Plectrovirus</i>	<i>coliphage Ff</i> <i>Acholeplasma phage L51</i>	Non enveloppé, filamenteux ou en forme bâtonnet, génome circulaire ssDNA
<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i> <i>Spiromicrovirus</i> <i>Bdellovibrio phage MAC1</i> <i>Chlamydiamicro-virus</i>	<i>Coliphage ΦX174</i> <i>Spiroplasma phage SpV4</i> <i>Bdellovibrio phage MAC1</i> <i>Chlamydia phage Chp1</i>	Non enveloppé, icosaédrique, génome circulaire ssDNA
<i>Cystoviridae</i>	<i>Cystovirus</i>	<i>Pseudomonas phage Φ6</i>	Enveloppé, icosaédrique, génome fragmenté dsARN
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i> <i>Allolevirus</i>	<i>enterobacteriophage MS2</i> <i>enterobacteriophage Qβ</i>	Non enveloppé, icosaédrique, génome Linéaire ssARN

En outre la plupart des genres de phages ont été assignés par un nom vernaculaire latinisé, 6 genres ont été créés au sein de la famille *Myoviridae* (Tableau 2), 6 dans la famille *Siphoviridae* (tableau3) et 3 dans la famille *Podoviridae* (Tableau 4) [17].

Tableau 2: Les signes distinctifs des genres Myoviridae

Propriétés Genres des phages	Infection	Génome	Hôtes
<i>T4-like phages</i>	Virulents	~ 170 kbp , avec permutation circulaire, cytosine remplacé par le 5 hydroxyméthylcytosine	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
<i>P1-like phages</i>	Tempérés	~ 100 kbp , avec permutation circulaire limitée	<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i>
<i>P2-like phages</i>	Tempérés	~ 33 kbp , le génome Unique	<i>Hemophilus</i>
<i>Mu-like phages</i>	Tempérés	~ 40 kbp , consistant du génome de phage avec DNA de cellule	enterobacterie
<i>SP01-like phages</i>	Virulents	140-160 kbp , le génome unique, thymine remplacé par le 5-hydroxyméthyluracil	<i>Bacillus</i> sp.
□ <i>H-likeviruses</i>	Tempérés	~ 59 kbp linéaires ds DNA, avec permutation circulaire	<i>Halobacterium</i>

Tableau 3: Les signes distinctifs des genres Siphoviridae

Propriétés Phages	Infection	Génome	Hôtes
□-like phages	Tempérés	~ 49 kbp , le génom unique	Entérobactérie
T1-like phages	Virulent	~ 49 kbp , avec permutation circulaire limitée	Entérobactérie
T5-like phages	Virulent	~ 121 kbp , unique	<i>Vibrio</i>
L5-like phages	Tempérés	~ 49 kbp , le génom Unique	<i>Mycobacterium</i> sp.
c2-like phages	Virulent	~ 49 kbp , le génom Unique	<i>Lactococcus</i> sp.
□M-like viruses	Virulent	~ 30 kbp linéaires dsDNA, avec permutation circulaire	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>

Tableau 4: Les signes distinctifs des genres Podoviridae

Propriétés Genres	Infection	Génome	Hôtes
T7-like phages	Virulents	~ 40 kbp , le génome unique	<i>Kluyvera</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>

3. Mise en évidence et numération des bactériophages

Par diffusion, les phages rencontrent leurs cibles, se multiplient uniquement dans les bactéries en croissance. Une bactérie infectée va libérer les virions au sein du tapis bactérien en pleine croissance ce qui va conduire à l'infection - grâce à la diffusion- puis à la lyse des bactéries avoisinantes en phase de croissance, et ce au rythme du cycle du phage.

L'arrêt de l'infection se fait naturellement lorsque les bactéries ne se multiplient plus. Le diamètre d'une plage de lyse ayant pour origine l'infection d'une seule bactérie par un phage dépend de l'efficacité d'infection, de multiplication, de lyse et de diffusion du bactériophage. Si le nombre des bactériophages mis au contact des bactéries est trop élevé, le phénomène d'éclaircissement est généralisé à tout le tapis bactérien, la lyse est à confluence des plages. En fonction de sa concentration, chaque dépôt donne une tâche claire de plages de lyse à confluence ou une tâche trouble parsemée de petites plages de lyse. Le dénombrement grossier est ainsi possible (**Figure 4**).

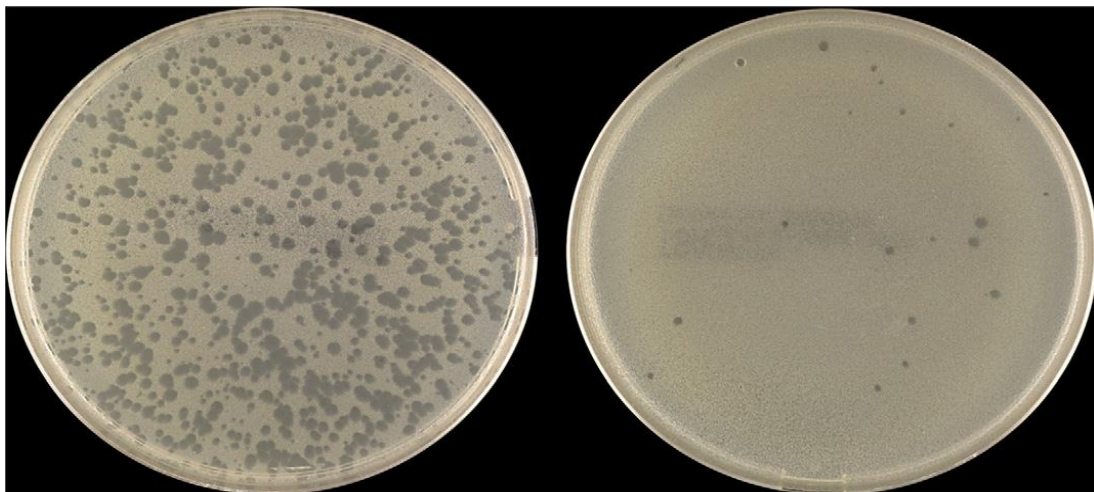


Figure 4 : culture de *Staphylococcus aureus* : -à gauche=colonies nombreuses
- à droite=colonies rares [3]

Statistiquement, chaque bactériophage s'est adsorbé à une bactérie et une seule et conduit à l'apparition d'une plage claire (plage de lyse) au niveau de la culture **[43]**.

POUVOIR PATHOGENE DES BACTERIOPHAGES

IV.1. Fonctionnement d'un bactériophage :

Tout d'abord, pour infecter une bactérie, un phage va venir se fixer sur celle-ci en reconnaissant des récepteurs spécifiques sur sa paroi. Après s'être lié à la bactérie, celui-ci va injecter son matériel génétique qui peut se présenter sous la forme d'ARN ou d'ADN à simple ou double brin. Une fois à l'intérieur, son matériel génétique utilise le métabolisme de la bactérie afin de synthétiser les éléments viraux nécessaires à la réplication des phages. Entre temps, ce même matériel génétique viral commande la synthèse d'une enzyme spécifique responsable de l'éclatement de la paroi bactérienne : **l'endolysine**. Enfin, la nouvelle génération de phages est libérée et le cycle recommence. Ce cycle est appelé *cycle lytique*. Il dure environ trente minutes.

On note, toutefois, l'existence d'un autre cycle parallèle au précédent appelé *cycle lysogénique* avec la capacité d'intégrer le génome au sein de celui de son hôte et de rester ainsi «silencieux». L'intérêt de la phagothérapie est d'utiliser les phages lytiques, les plus virulents, ceux à l'origine de la lyse bactérienne [44].

On distingue donc deux classes de phages : *Les phages lytiques* (la très grande majorité) et *les phages tempérés* (10 à 20% des phages présents dans la nature).

Sous l'influence de certains signaux, le génome du phage tempéré s'excise et entame alors un cycle lytique complet identique au cycle des phages strictement lytiques. En réalité, les observations effectuées en laboratoire montrent que seule une petite fraction des phages tempérés « choisit » d'intégrer son génome.

La très grande majorité se comporte comme des phages strictement lytiques. Pour simplifier et conclure sur la nature des phages, on peut retenir que tous les phages sont lytiques et que seuls quelques-uns manifestent un caractère tempéré. [45]

IV.2. L'infection lytique, les phages virulents :

Le processus infectieux d'un bactériophage lytique débute par sa fixation sur un motif (cible) spécifique situé à la surface de la bactérie hôte (**Figure 5**).

Le cycle lytique:

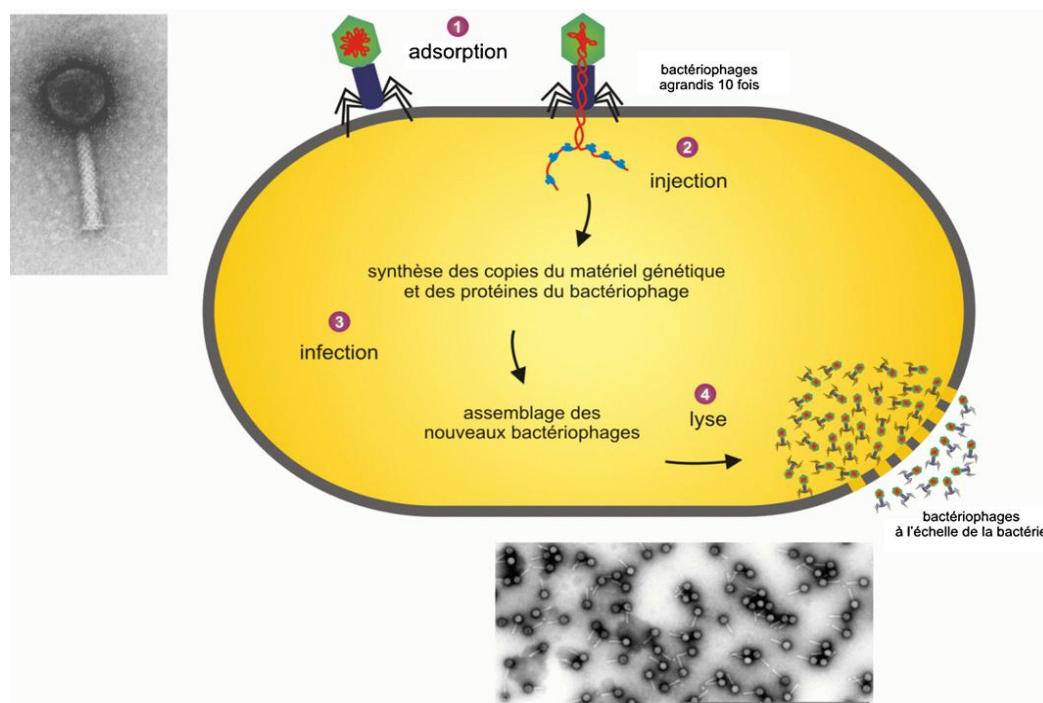


Figure 5 : Cycle lytique d'un bactériophage [3].

Si le nombre de bactéries et de bactériophages n'est pas dans un rapport optimal, l'infection ne se produit pas [46]. Si elle a lieu, la bactérie donne naissance à plusieurs dizaines de phages en moins d'une heure et est lysée. Les

nouveaux phages rencontrent les bactéries voisines et reproduisent d'autres cycles lytiques. Ainsi, le nombre de phages augmente de façon exponentielle, tandis que le nombre des bactéries diminue rapidement. Dès que la quantité de bactéries est trop faible, le processus s'arrête.

Au cours de la réplication des génomes (ADN), qu'ils soient bactériens ou phagiques, il se produit (spontanément à des taux variables) des erreurs de copie (appelées mutations) du matériel génétique qui créent une population hétérogène. Pour les bactéries, le hasard d'une mutation peut modifier des récepteurs présents à leur surface.

Ces bactéries deviennent alors résistantes au bactériophage. Mais les bactériophages produits en très grand nombre sont capables, par le même processus, de s'adapter aux modifications des récepteurs bactériens.

Sous l'influence des mutations successives, bactéries et bactériophages évoluent dans un balancement dynamique continu qui autorise alternativement le développement de l'un ou de l'autre des deux acteurs, tout en assurant la pérennité de l'autre [46].

a-L'adsorption spécifique :

La rencontre d'un phage et d'une bactérie se fait au hasard et sa probabilité dépend du nombre de bactéries et de phages. Le phage se fixe sur des récepteurs spécifiques de la bactérie présents soit sur la paroi (lipo-polysaccharide, protéines, acides téichoïques) [47], soit sur la membrane cellulaire (bactéries appartenant à la classe des *Mollicutes*), soit sur les flagelles, soit sur les pili communs soit sur les pili sexuels. Dans ce dernier cas, les phages, sont qualifiés d'anti-mâles. C'est le cas des phages classés dans la famille des *Leviviridae*[17].

Pour les phages de l'ordre des *Caudovirales*, la fixation fait intervenir une fibre de la queue qui se lie à un récepteur de la paroi (**Figure 6**).

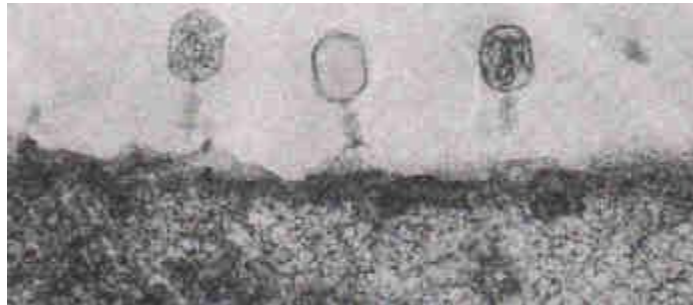


Figure 6 : Les phages T4 adsorbés à la surface d'*Escherichia coli*, vus au microscope électronique, on remarquera que le phage central a déjà injecté son ADN. [48].

Très rapidement les autres fibres se fixent sur le récepteur ce qui arrime solidement le phage à la bactérie et permet la mise en contact de la plaque terminale avec la paroi bactérienne.

Pour que l'adsorption soit possible, il faut que les récepteurs phagiques et bactériens présentent une étroite spécificité l'un envers l'autre. Une bactérie n'est donc sensible qu'à un nombre limité de phages et un phage n'est capable d'infecter qu'un nombre restreint de bactéries.

b-Pénétration (injection) du génome phagique dans la bactérie :

La pénétration est variable selon les phages. Certains d'entre eux pénètrent en totalité dans la bactérie et l'acide nucléique n'est libéré qu'après désintégration de la capside. Pour d'autres bactériophages, seul l'acide nucléique pénètre dans la cellule.

Dans le cas des *Myoviridae*, le lysozyme présent au niveau de la plaque terminale provoque une destruction du peptidoglycane et une perforation de la

paroi. De manière concomitante, le contact entre la plaque terminale et la paroi provoque la contraction des anneaux protéiques de la gaine contractile ce qui conduit à une pénétration du canal central dans la bactérie. L'ADN double brin présent dans la tête du phage transite dans le tube central creux et il est injecté dans le cytoplasme bactérien. [17]

c -L'expression du génome viral :

La multiplication nécessite l'expression du génome injecté qui va détourner la machinerie de biosynthèse de la cellule hôte pour la synthèse des acides nucléiques viraux et de protéines nécessaires pour assembler les progénitures des virions.

Les phages avec génomes de petit ADN (ont la capacité limitée de codage) utilisent L'ADN et l'ARN polymérases de la cellule hôte pour la réplication et la transcription de l'ADN, alors que les phages avec génomes de large ADN (et, par conséquent, une plus grande capacité de codage), généralement encodent L'ADN et l'ARN Polymérases de phage.

Les phages à ARN encodent l'ARN-polymérase par un ARN-dépendent (aussi appelé réplacase ou transcriptase) pour la réplication et la transcription d'ARN du phage.

Il n'y a pas de régulation temporelle de l'expression des gènes pour les phages de petits génomes: la quasi-totalité des gènes du phage commence à être transcrite et traduite peu après l'injection, ces gènes continuent à être exprimés tout au long de l'infection.

En revanche, la multiplication des phages avec génomes de large ADN exige la régulation temporelle de la synthèse de macromolécules du phage qui se

produites habituellement pendant les trois phases: la synthèse des produits précoces, de la progéniture d'ADN du virus et, enfin, des produits tardifs.

Les produits précoces codent l'ADN, l'ARN et les protéines de synthèse de l'hôte et adaptent un mécanisme cellulaire de biosynthèse de phages qui commence par la réplication de l'ADN du phage. Les produits des gènes tardifs codent pour des produits nécessaires pour l'assemblage des progénitures du phage. [17]

d-L'Assemblage des progénitures du phage :

L'assemblage est un phénomène complexe, il existe trois "chaînes de montage" spécialisées dans l'assemblage de la tête, la queue et des fibres.

d.1. La tête :

L'assemblage de beaucoup de virus consiste en une succession d'événements qui peuvent se décomposer en la formation d'une particule précurseur, non infectieuse qui par la suite est convertie en une forme mature, infectieuse. Cette dernière transition est appelée maturation. L'étude des cycles d'assemblage de phages est fondamentale afin d'isoler les protéines ayant une fonction cruciale voire inhibitrice dans les assemblages viraux.

Le cycle menant à la production d'une capside mature contenant l'ADN varie d'un bactériophage à un autre.

Plusieurs cycles d'assemblage de phages à queues ont été étudiés en détail parmi lesquelles ceux des bactériophages T4, T7, HK97, λ d'*E.Coli*, P22 de *SalmonellaTyphimurium*, Φ 29 et SPP1 de *Bacillus Subtilis*. Ces études ont montré que chaque bactériophage adopte ses propres stratégies pour la construction de sa capside. Néanmoins, d'un phage à un autre, des protéines

ayant des fonctions similaires sont utilisées pour l'assemblage de la capside de phages qui au final ont des tailles et formes variées [49]. (**Figure 7**)

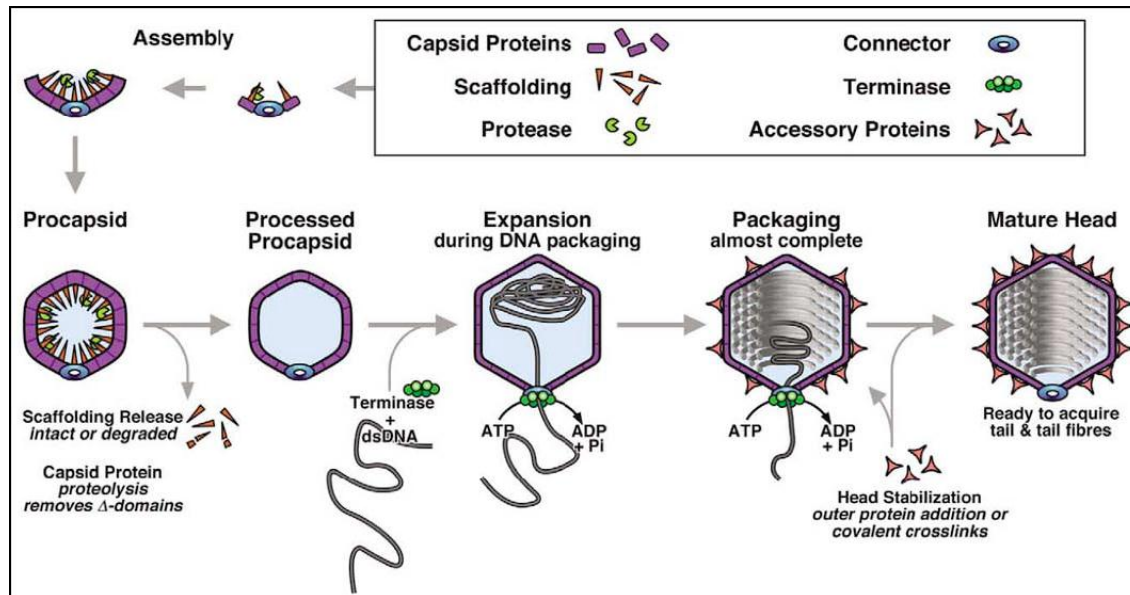


Figure 7. Schéma général des différentes étapes dans l'assemblage des capsides des phages de la famille des Caudovirales ainsi que les différentes protéines invariablement impliquées : protéines de capside, protéine d'échafaudage, protéase, terminases, protéine(s) formant le connecteur, protéine de décoration [49].

d.1.1. La formation d'un précurseur : la procapside

In vivo, le point de départ de la construction de la procapside est généralement admis comme étant chez beaucoup de phages la protéine portail. Cette protéine forme un dodécamère en forme d'anneau [50;51] qui par la suite deviendra le composant central du connecteur [52].

Ce dodécamère sert en quelque sorte de point de nucléation à la polymérisation de la (ou les) protéine(s) de capside majeure sous le contrôle de la protéine d'échafaudage (ou du domaine N-terminal de la protéine de capside

majeure dans le cas où le phage ne posséderait pas de protéine d'échafaudage indépendante [53]).

En l'absence de protéine d'échafaudage, les structures formées sont souvent aberrantes et non fonctionnelles [54]. Pour le phage P22, l'assemblage d'une procapside correcte se fait par ajout successif des protéines de capsid, seule ou en complexe avec la protéine d'échafaudage suivant le type d'interactions locales possibles [55].

La procapside des phages à queue est une capsid virale non infectieuse, instable, de taille plus petite que la capsid finale [56;57].

d.1.2. Clivage protéolytique

D'une manière générale, une procapside de bactériophage est constituée par le connecteur à l'un de ces sommets, les multiples copies de la (les) protéine(s) de capsid majeure et les protéines d'échafaudage. La totalité des protéines de capsid majeure s'arrange suivant une symétrie icosaédrique contrairement au connecteur [58;59] et aux protéines d'échafaudage [60] qui sont autant de brisure de symétrie.

L'étape suivante dans le cycle d'assemblage des bactériophages à queue est l'élimination des protéines d'échafaudage ou des domaines ayant cette fonction soit par clivage par la protéase virale contenue dans la procapside [61;62] ou soit sous une forme intacte lorsqu'il n'y a pas de protéase virale (phage T7 [63] et P22 [64] par exemple). Entières ou fragmentées, les protéines d'échafaudage sont évacuées par les pores de la procapside et il en résulte donc un volume interne plus grand, nécessaire à l'incorporation de la totalité de l'ADN viral.

d.1.3. L'expansion : transition procapside – capsid

L'étape concomitante à l'élimination des protéines d'échafaudage est l'incorporation de l'ADN viral dans la capsid. Cette entrée se fait par le connecteur formé dans les cas les plus simples par la protéine portail et les petite et grande sous unités d'enzymes virales appelées terminases. Ce processus a été longtemps étudié et l'un des scénarios est que le connecteur se comporte comme un moteur moléculaire qui, à chaque hydrolyse d'ATP, tourne d'un certain pas entraînant avec lui l'ADN à l'intérieur de la capsid [65].

Une fois la totalité de l'ADN introduite, celle-ci est clivée par les terminases et l'ouverture du connecteur est bloquée par l'ajout de protéines de complément et de la queue du phage.

In vivo, l'entrée d'une molécule fortement chargée négativement comme l'ADN à l'intérieur de la procapsid, déjà déstabilisé par le départ des protéines d'échafaudage, force progressivement les protéines de capsid majeure à se réorganiser, tout en conservant l'intégrité de celle-ci, jusqu'à ce que s'établissent de nouvelles interactions entre sous unités comme cela a été montré in vitro avec le phage HK97 [66].

d.1.4. La stabilisation

Pour s'accommoder de la présence de l'ADN emmagasiné sous pression dans sa capsid (environ 6MPa pour une concentration maximale de 500 mg/ml) [67], la plupart des bactériophages ont recours à une dernière étape visant à augmenter la stabilité de l'ensemble capsid/ADN. Deux stratégies différentes sont employées :

- L'addition en surface d'une ou plusieurs protéines de capsid mineure (la protéine GpD pour le phage λ [68;69], les protéines Hoc et surtout Soc pour le phage T4) [70] qui augmentent la résistance globale de la capsid.
- L'établissement de nouvelles liaisons covalentes, par un mécanisme auto catalytique, entre toutes les sous unités de la protéine de capsid majeure créant un enchevêtrement des sous unités les unes avec les autres à la manière des anneaux d'une chaîne [71;72].

d.2. La queue :

On prend comme exemple l'assemblage de la queue du phage T4, dont au moins les produits de 22 gènes sont impliqués dans l'assemblage de la queue du phage T4. La voie d'assemblage de la queue est strictement basée sur les interactions des protéines par ordre séquentiel [73].

Les baseplates, remarquablement ont une structure multi-protéiques complexes qui sert d'unité de contrôle de l'infection par le T4, sont assemblées en premier. Le baseplate est composé d'environ 150 unités d'au moins les produits de 16 gènes différents sont oligomériques. Le baseplate est assemblé à partir de six portions identiques. Le gp11 (le STF connecting protein), gp10, gp7, gp8, gp6, gp53, et gp25 sont combinées pour construire un coin. Le noyau central est constitué par gp5, gp27 [74] et gp29. L'assemblage de baseplate est complété par l'adjonction de gp9, le STF-connexion protéines, STFs, gp48, et gp54. Les deux dernières protéines sont nécessaires pour initier la polymérisation du tube de la queue. Le tube de queue est terminé avec gp3 [75;76]. Le tube de la queue sert de modèle pour l'assemblage de gp18 qui forme la gaine contractile de la queue.

La longueur du tube de la queue est probablement déterminée par la gp29, qui participe également à l'assemblage des baseplates[77]. La longueur de la gaine de la queue est déterminée par le tube. Le tube de la queue et la gaine ont une symétrie hélicoïdale avec une hauteur de 40.6\AA et des sous-unités répétées successivement tous les 17.7\AA [73].

L'assemblage de la queue est complété par une gp15 hexamère qui lie le dernier anneau de la gaine de la queue [78]. La queue s'associe à la tête après compactage de l'ADN. L'assemblage de la queue et de la gaine représente une structure métastable supramoléculaire qui subit des changements de conformation après liaison des phages à des récepteurs de la cellule hôte. Au cours de la contraction irréversible, la longueur de la gaine diminue de 980\AA à 360\AA , et son diamètre extérieur augmente de 210\AA à 270\AA [79].

d.3. Les fibres :

Le phage T4 contient trois types de protéines fibreuses: des fibres longues (LTFs), des fibres courtes (STFs), et moustaches. Chaque LTF se compose par une partie proximale codée par le gène 34 et une partie distale codée par le gène 37. Les deux parties sont reliées par gp35 et gp36 qui forment une région charnière. Les protéines qui forment la LTF sont homotrimères, sauf que pour gp35 est assemblé comme un monomère.

Les fibres courtes (STFs) codées par gp12 qui interagissent avec le lipopolysaccharide de la bactérie lors de l'infection [73].

e- La lyse de la bactérie :

La plupart des phages néoformés nécessite la lyse bactérienne. Dans ces cas, un produit de gène de virus est produit et hydrolyse progressivement le

peptidoglycane de la cellule hôte, affaiblissant ainsi suffisamment la cellule et une pression osmotique interne peut éventuellement provoquer la lyse cellulaire.

L'exception de libération par ce mécanisme est les phages filamenteux, qui sont libérés par extrusion à travers les membranes cellulaires, et les phages mycoplasmaïques, qui sont libérés par bourgeonnement à travers les cellules de l'hôte. Les infections productives conduisent à la libération de 20 à 1000 de phages par cellule infectée, en fonction des conditions de la croissance cellulaire [17].

IV.3. L'infection non lytique, les phages tempérés :

La différence majeure entre un phage tempéré et un phage lytique réside dans le fait que le phage tempéré a la capacité d'intégrer son génome à celui de son hôte (bactérie), de rester ainsi « silencieux » et de se multiplier avec lui (cycle lysogénique).

Ces phages tempérés, encore appelés « prophages », sont copiés à chaque division cellulaire avec l'ensemble de l'ADN appartenant à la bactérie hôte, jusqu'au moment où, sous l'influence de certains stimuli (comme les UV, par exemple), le génome du phage s'excise. Dès lors, le phage « libéré » entame un cycle complet à l'instar des phages strictement lytiques. C'est au moment de cette excision que le phage tempéré est capable d'« emprunter » de manière aléatoire une partie du génome de son hôte pour infecter des hôtes phylogénétiquement proches.

En apportant du matériel de la bactérie précédente et en l'intégrant dans une nouvelle bactérie, il en découle des remaniements génétiques. Ultérieurement, le phage, initialement tempéré, retrouve cet état ou réalise un nouveau cycle

lytique. L'analyse (par séquençage) des génomes bactériens permet d'observer l'importance de l'impact des bactériophages tempérés dans la nature sur l'évolution bactérienne. Le record serait atteint par le génome d'*E.coli*O157 : H7 qui accumule un tel nombre de prophages que cette bactérie n'est plus qu'un énorme prophage. Bien qu'ayant une importance majeure, les phages tempérés ne représentent qu'une faible partie (environ 10 %) des phages actuellement connus présents dans la nature.

De ces notions, bien établies aujourd'hui, il en résulte que l'utilisation en phagothérapie de phages tempérés est à écarter. Elle n'offre pas d'intérêt avec l'objectif de détruire les bactéries pathogènes. En revanche, cette capacité de transporter des fragments d'ADN d'une bactérie hôte à l'autre fait que ces phages sont utilisés au laboratoire comme « outils » vecteurs par les généticiens.

[80]

Le cycle lysogénique (Figure 8) se présente selon le schéma suivant :

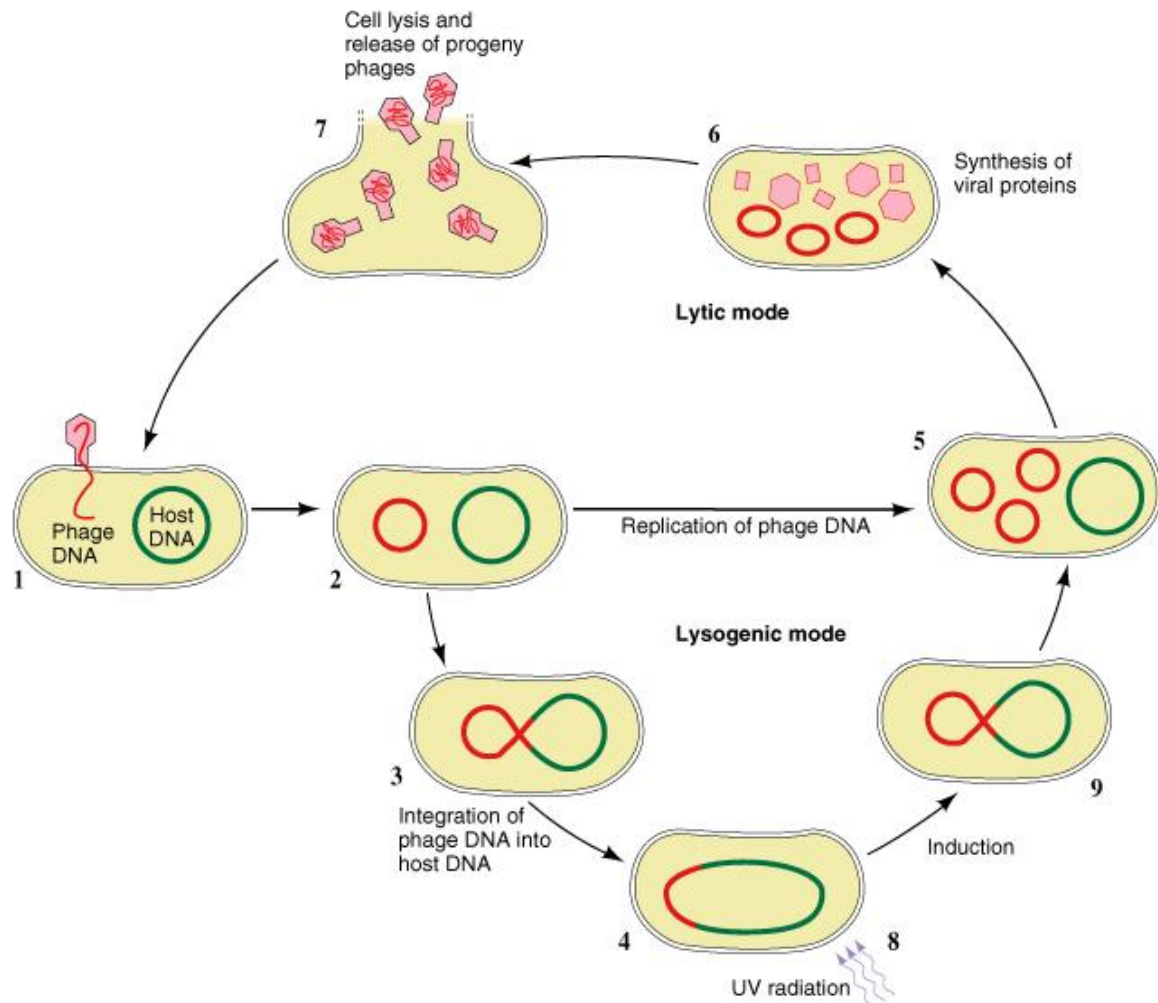


Figure 8 : Schéma général du cycle de vie du bactériophage tempéré λ [81].

Des bactériophages, appartenant tous à l'ordre des *Caudovirales*, sont appelés des phages tempérés. Ces phages peuvent établir avec les bactéries des rapports de longue durée, éventuellement réversibles, qualifiés de lysogénie.

La bactérie est dite lysogène et le cycle de réplication phagique est appelé cycle lysogénique. Au cours de la lysogénie, l'ADN phagique est intégré au chromosome bactérien sous la forme d'un prophage incapable de se répliquer de

façon autonome. La réplication du prophage est liée à celle du chromosome bactérien.

La lysogénie a été découverte avec le phage λ (*Enterobacteria phage λ*) infectant *Escherichiacoli* [82]. Le phage λ (famille des *Siphoviridae*) est constitué d'une tête et d'une queue non contractile. L'ADN phagique est un ADN bicaténaire, linéaire, possédant à ses extrémités des brins monocaténaires (12 nucléotides), dont les séquences en bases sont complémentaires ce qui permet des appariements. Ces séquences monocaténaires sont parfois dénommées bouts collants.

Après la pénétration du génome phagique dans le cytoplasme bactérien, l'ADN phagique se circularise grâce à l'appariement des bouts collants. Sous forme circulaire, l'ADN du phage λ s'intègre dans le chromosome bactérien, sans perte de matériel génétique. Cette intégration fait intervenir le gène *int* qui code pour une intégrase ainsi que des sites d'attachement (sites att) présents sur l'ADN phagique (att P) et sur l'ADN bactérien (att B). Le site att B est situé entre les opérons galactose (*gal*) et biotine (*bio*).

Sous forme intégrée, l'ADN phagique ou prophage perd ses capacités de réplication autonome, il se réplique en même temps que le chromosome bactérien et, lors de la division bactérienne, il est transmis aux cellules filles.

Le phage λ ne s'intègre qu'entre *gal* et *bio*, mais d'autres phages, comme le phage P2 (*Enterobacteria phage P2*, famille des *Myoviridae*) d'*Escherichia coli* ou le phage P22 (*Enterobacteria phage P22*, famille des *Podoviridae*) des *salmonelles*, peuvent avoir plusieurs sites d'intégration. Le phage Mu-1 (*Enterobacteria phage Mu-1*, famille des *Myoviridae*) peut s'intégrer totalement au hasard sur une molécule d'ADN bactérien.

La lysogénie présente deux caractéristiques : (i) une absence d'expression des gènes phagiques impliqués dans le cycle productif et (ii) une protection vis-à-vis de l'infection par un phage homologue. Ces deux caractéristiques sont liées à la présence d'un répresseur.

Le répresseur est une protéine synthétisée par le bactériophage et qui se fixe sur des opérateurs viraux. Ce répresseur bloque la majorité des fonctions virales et seules quelques fonctions précoces sont conservées et peuvent s'exprimer dans la bactérie lysogène. Le répresseur peut être inactivée et cette inactivation permet l'expression du prophage et conduit à un cycle productif analogue à celui étudié pour le phage T4.

L'induction (ou passage d'un cycle lysogénique à un cycle productif) peut être spontanée ou induite. L'induction spontanée est rare. Selon le phage et la bactérie, elle se produit à une fréquence variant de 10^{-2} (toutes les 100 divisions bactériennes) à 10^{-6} . La fréquence de l'induction est augmentée par les rayons UV, les rayons X, l'ypérite, l'éthylène-imine, des peroxydes organiques, etc. Ces agents inactivent le répresseur et permettent alors l'expression totale du génome phagique. Le gène *xis* permet la synthèse d'une excisase qui, associée à l'intégrase, inverse son processus et permet une excision. Le prophage est alors libéré et le cycle productif peut se dérouler normalement.

Une modalité particulière d'induction est obtenue en croisant une bactérie lysogène et une bactérie non lysogène. Dans ces conditions, on n'obtient pas de recombinants car les bactéries non lysogènes sont lysées. En effet, lorsque le prophage de la bactérie lysogène pénètre dans la bactérie non lysogène, dépourvue de répresseur, le prophage s'excise et déclenche un cycle productif.

Cette induction provoquée par la conjugaison est appelée induction zygotique[83].

Le prophage apparaît donc comme un gène létal potentiel, existant à l'état réprimé chez une bactérie et transmissible à la descendance.

IV.4. Modification de la pathogénie des bactéries par les bactériophages

Avec le temps, de nombreux résultats de recherche montrent que non seulement les phages contribuent à l'évolution des bactéries par le biais de la transduction mais, aussi ceux-ci contribuent directement à la toxicité des bactéries. L'acquisition de nouveaux gènes par l'intermédiaire d'un phage lysogène peut, dans certains cas, modifier sensiblement la pathogénie de la bactérie. Ainsi, il a été montré que certaines toxines contribuant significativement à la nocivité d'une bactérie sont codées par des gènes de bactériophages. Par exemple, la toxine du choléra est contenue dans le génome du bactériophage filamenteux CTXΦ qui infecte les bactéries *Vibrio Cholerae*[84].

Par ailleurs, certains gènes portés par des phages peuvent modifier profondément n'importe quelle étape du processus infectieux d'une bactérie comme l'adhésion, la colonisation, l'invasion, la résistance aux défenses immunitaires, la sensibilité aux antibiotiques et la transmissibilité entre humains.

AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA PHAGOTHERAPIE

V.1. Les avantages de la phagothérapie

✓ Un avantage très important concerne la résistance des bactéries vis-à-vis des bactériophages. En effet, cette résistance existera toujours. Mais à la différence des antibiotiques, les bactériophages sont des organismes « vivants ». Certes, on peut contester l'appellation « vivant » concernant ces virus, mais ce ne sont pas de banales molécules inertes. Les bactériophages évoluent, au même titre que les bactéries. Les phages changent avec le temps par des mutations et ils auront toujours la capacité d'infecter les bactéries, même si ces dernières développent de nouvelles résistances.

Donc les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques continuent à être attaquées et tuées par les bactériophages virulents. Il s'agit de processus aussi ancien que la vie sur terre en constante évolution [3].

✓ A la différence des antibiotiques, les bactériophages ont la capacité de se répliquer et ceci très rapidement. On peut donc réaliser de nombreuses économies, tant sur le plan financier que sur le plan humain. Du fait de la multiplication des phages, il n'est pas nécessaire d'administrer de fortes doses de phages, ni de le faire sur le long terme. Tant que l'infection pathogène persiste, les phages persistent.

Le coût du traitement par les phages est donc beaucoup plus faible que celui des antibiotiques. On peut donc aisément constituer des « stocks ».

Un argument qui peut peser face aux antibiotiques, est la diversité des bactériophages. A quelques rares exceptions près, il existe au moins un bactériophage qui peut infecter une bactérie [16]. Il ne reste plus qu'à isoler le ou les phages pour s'attaquer à une infection donnée, chose très aisée face aux

années de recherches qu'implique la découverte d'une nouvelle famille d'antibiotiques.

- ✓ L'avantage de l'étroite spécificité des bactériophages pour leur cible réside dans le fait qu'ils ne se multiplient qu'au sein de l'infection. Cette particularité les oppose aux antibiotiques, responsables du déséquilibre des flores, elles-mêmes à l'origine de troubles digestifs, mycoses et infections opportunistes secondaires. Il est, en outre, nécessaire d'administrer les antibiotiques régulièrement pour palier leur élimination (destruction et/ou excrétion) continue par l'organisme.

À l'inverse, le bactériophage se multiplie in situ tant qu'il rencontre la bactérie et est éliminé après la guérison de l'infection. Comparé à un antibiotique, une suspension de bactériophages peut être considérée comme un médicament « intelligent » et, de surcroît, sans effets secondaires majeurs. [3]

- ✓ Pearl et al. [85], auraient montré que même des bactéries quiescentes - c'est à dire que ces bactéries disposent d'un mécanisme de défense consiste à produire un polysaccharide qui leur permettent de persister à l'état quiescent au sein de microcolonies- pouvaient être lysées par des bactériophages, chose qui n'est pas démontrée avec les antibiotiques.

V.2. Les inconvénients de la phagothérapie

- Un inconvénient, qui est aussi un avantage dans certains cas, est beaucoup plus problématique: celui de la flexibilité du génome des phages. En effet, il est très facile de manipuler génétiquement ces virus. Cette propriété a contribué au développement du génie génétique [86]. Les transferts de gènes sont fréquents,

non seulement entre souches de bactériophages, mais aussi entre bactéries. Et ceci peut avoir de graves conséquences lorsque les gènes transférés sont des gènes de résistance aux antibiotiques ou aux bactériophages. Pire encore, les phages peuvent transporter dans leur génome des gènes de pathogénicité. Et si l'un d'entre eux transfère ce gène à une bactérie, il peut créer une souche mutante pathogène pour l'homme [87].

Ce phénomène pourrait être un frein majeur à l'utilisation massive des bactériophages. En effet, le transfert de gènes de facteurs de virulence pourrait avoir de graves conséquences pour nous. Puisque le contact entre phages et bactéries serait augmenté, on peut s'attendre à une hausse de ces phénomènes très néfastes pour l'homme. Et on peut se douter que la « malléabilité » du génome des phages puisse se retourner contre l'homme, donnant lieu à l'apparition de nouveaux virus pathogènes. Un risque qui n'est pas acceptable alors que nous nous trouvons en pleine crise de grippe aviaire par exemple, bien que ce ne soit qu'une hypothèse reposant sur le principe de l'évolution.

- Si, comme les antibiotiques, on a recours massivement à la phagothérapie, il y'a un risque de diminution de la virulence des phages. Mais cette diminution se traduirait dans de nombreux cas par une diminution de la virulence des bactéries, voire leur transformation en bactérie inoffensive pour l'homme sous la pression sélective. Le phénomène de résistance à laquelle nous faisons allusion, est à ne pas confondre avec la simple inefficacité. Le milieu, par exemple, dans lequel on va placer le bactériophage, peut être non favorable à sa réplication.

- Un autre inconvénient est la trop grande spécificité des phages. Lors d'une visite médicale, le médecin n'analyse souvent pas précisément la bactérie

mise en cause lors d'une infection bactérienne. C'est pourquoi on a inventé les antibiotiques à large spectre, afin d'avoir plus de chance de s'attaquer à la bactérie responsable de l'infection. Une utilisation des bactériophages poserait des problèmes aux professionnels de santé **[88]**.

- Les industries pharmaceutiques ne semblent pas intéressées par ce principe naturel qui ne peut pas être protégé par des brevets. Modifié génétiquement, un phage deviendrait un OGM (Organisme Génétiquement Modifié) soumis à des contraintes qui rendraient son acceptation et sa commercialisation difficiles à des fins thérapeutiques.

Nouveaux arguments en faveur de la thérapie par les phages

Des faits oubliés comme des découvertes récentes devraient faire envisager la phagothérapie sous un autre angle, *comme un complément de l'antibiothérapie et non seulement comme une simple « alternative »* [89;90]. Ces arguments découlent :

- des remarques faites, dès l'apparition des premiers antibiotiques et confirmées récemment, sur les interactions synergiques phages—antibiotiques ;
- de l'étude des microsystemes et de la formation des biofilms comme la connaissance de l'hydrolyse de ceux-ci par certains bactériophages ;
- de l'inhibition par des bactériophages d'un système de secours (appelé SOS) du génome bactérien qui intervient, notamment, comme réparateur dans la synthèse de l'ADN bactérien en réponse aux perturbations provoquées par des antibiotiques.

VI.1. Premier argument : interactions phages—antibiotiques

Il est remarquable de souligner qu'il avait été observé des synergies entre phages et antibiotiques sur les bactéries. Ces observations ne semblent pas avoir été retenues avec suffisamment d'attention. Cependant, ces résultats ne sont pas sans intérêt.

Les effets in vitro de l'association bactériophage—pénicilline sur le *staphylocoque aureus* ont été soulignés par une communication de Neter dès 1944 [91] et confirmés par Himmelweit[92] l'année suivante. Devant les résultats encourageants, Mac Neal a analysé cette combinaison non seulement sur des staphylocoques mais aussi sur des streptocoques et le colibacille tant in vitro qu'in vivo. Tous ces travaux décrivaient des synergies plus ou moins importantes.

Plus précisément, l'effet de l'association in vitro obtenu par Himmelweit avec un bactériophage et de la pénicilline s'est révélé très remarquable sur *Staphylococcus aureus*.

En partant de 130 millions de bactéries par millilitre, au bout d'un délai identique (deux heures), il y n'a que peu d'effet avec la pénicilline seule utilisée à des concentrations efficaces (réduction de 130 à 120 millions de bactéries par millilitre), mais il y a une diminution de moitié (de 130 à 60 millions de bactéries par millilitre) avec le bactériophage seul, et une lyse notable (de 130 à 0,2 million de bactéries par millilitre) en association.

Mais, plus surprenant, avec ce même bactériophage combiné à des concentrations sub-inhibitrices de pénicilline, cet effet synergique s'observe encore.

Les années suivantes, avec une telle association, l'évolution favorable de quelques pathologies graves ont été rapportées [93-95], mais les tentatives de l'expliquer sont restées vaines et apparemment sans suite.

En 2008, une observation fortuite a été faite sur les boîtes d'un antibiogramme pratiqué directement à partir de l'urine d'un patient infecté par *Escherichia coli* [96]. Des images de lyse (plages claires) sont apparues en périphérie de certains disques d'antibiotique. En présence de différents bactériophages lytiques pour la même souche bactérienne, une synergie (baptisée PAS, pour Phage-Antibiotic-Synergy) a été observée avec des bêta-lactamines (**aztréoname et céfixime**) et des **quinolones**, mais pas avec la gentamycine ni la tétracycline. Aucun mécanisme moléculaire particulier n'a cependant permis d'expliquer ce phénomène. L'explication reste à découvrir.

Il vient d'être montré [97] que des antibiotiques eux mêmes sont capables de mobiliser les phages lysogènes (prophages) portés par des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. En présence de certains antibiotiques (**acide fusidic, tobramycine, ciprofloxacine, cotrimoxazole, erythromycine, rifampicine et imipenem**) mais aussi dans d'autres conditions de stress auxquelles elles sont soumises, des bactéries sont capables de mobiliser par induction des prophages et par conséquent de favoriser la transmission de gènes exprimant des facteurs pathogènes indésirables (toxine, virulence, résistance).

Des antibiotiques utilisés sans précautions particulières pourraient donc être eux-mêmes à l'origine de la diffusion de résistances inquiétantes : *staphylocoques aureus de sensibilité diminuée aux glycopeptides* (GISA).

VI.2. Deuxième argument : biofilms et bactéries persistantes

Ce deuxième point met en exergue les biofilms comme structure omniprésente dans le développement des populations microbiennes in vivo.

On définit un **biofilm** comme étant: une communauté multicellulaire plus ou moins complexe et symbiotique de micro-organismes (bactéries), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

Adams et Park [98] avaient découvert la production d'une dépolymérase polysaccharidique phagique. En étudiant l'action des bactériophages sur *E. coli*, Stirm et al. [99] ont montré, qu'une dépolymérase liée aux fibres caudales du phage est capable de lyser une capsule protectrice. Lindberg[100], a précisé que pour y parvenir certains d'entre eux possèdent la propriété de se fixer préalablement sur un site, dit récepteur secondaire, à la surface d'une capsule polysaccharidique avec pour conséquence la libération de l'enzyme qui digère le polysaccharide et permet d'atteindre le récepteur primaire spécifique situé à la surface même de la paroi bactérienne. Cette activité particulière a été confirmée par Hughes et al. [101].

Bedi et al.[102] ont très récemment montré in vitro qu'un biofilm produit par une souche de *Klebsiella pneumoniae* est plus rapidement éliminé avec un bactériophage spécifique et l'**amoxicilline** associé qu'en traitement isolé. Cette remarque est d'autant plus intéressante que l'utilisation de certains antibiotiques pourraient, semble-t-il, favoriser la formation d'un biofilm [103].

VI.3. Troisième argument : inhibition du système SOS bactérien

L'existence d'un système inductible chez la bactérie capable de réparer les altérations de l'ADN appelé : **système SOS**, connu depuis plusieurs décennies [104], est parfois responsable de mutations capables d'entraîner une évolution adaptative des espèces.

Dans un travail récent la modification génétique d'un bactériophage a permis d'inhiber le système SOS d'une souche d'*E. Coli* [105]. L'action des quinolones a été notablement améliorée aussi bien in vitro qu'in vivo (en termes de survie chez des souris infectées) par des **phages OGM**. Dans ce même travail, le bactériophage avait été aussi modifié pour cibler les systèmes de gènes non SOS de la bactérie. Cette modification génétique a réduit, non seulement l'apparition des bactéries résistantes à l'antibiotique dans une population traitée, mais aussi amélioré l'action des antibiotiques sur les bactéries résistantes (dites persistantes) comme celles qui sont rencontrées in vivo dans les biofilms. L'empêchement du système SOS rendrait-il moins fréquentes les mutations favorables à l'apparition des résistances aux antibiotiques ? Il a été rapporté que plusieurs classes d'antibiotiques, et pas seulement ceux (comme les quinolones) qui ont pour cible la synthèse de l'ADN, peuvent activer le système SOS des bactéries leur assurant une riposte par mutation après réparation de l'ADN.

Les applications médicales de la phagothérapie

VII.1. Phagoprophylaxie

C'est l'utilisation des bactériophages comme moyen préventif contre les infections. Cette notion n'est pas nouvelle, car Félix d'Hérelle a aussi développé la théorie de la « guérison contagieuse » des diarrhées d'origine bactérienne par les bactériophages. Cette théorie est fondée sur l'observation de la guérison des populations au contact d'un sujet atteint d'une maladie entérique (comme la dysenterie bacillaire ou le choléra) et dont l'état évolue favorablement. Après avoir constaté que la guérison est précédée de l'excrétion dans les selles de bactériophages virulents pour la bactérie pathogène, il postula que les virus, répandus dans l'environnement (les mains sales, l'eau de boisson polluée) et absorbés par le voisinage, procurent *une protection* ou *la guérison anticipée transmissible*.

Ce mécanisme pourrait être une explication à l'histoire naturelle des épidémies comme celle du choléra dans les pays à hygiène précaire : survenue et extension de la maladie en l'absence de bactériophages lytiques pour le vibron, puis apparition d'un phage actif (par un jeu de mutation—sélection), et enfin extinction de l'épidémie lors de sa diffusion dans les eaux. La démonstration, déjà faite dans les années 1930 en Inde [106], a été confirmée par une étude bien conduite, il y a quelques années [107].

VII.2. Thérapie par les phages :

a) Anciennes applications :

Autrefois, de nombreuses applications médicales furent étudiées dans le monde entier et la phagothérapie connut un grand succès.

De grandes firmes pharmaceutiques commercialisèrent des préparations pour différentes indications dont le laboratoire du bactériophage (**Robert et Carrière**), en France.

Durant plusieurs décennies, des millions de malades ont été soignés avec ce principe pour de nombreuses infections, depuis les plus bénignes (plaies infectées, otites, gastro-entérites) jusqu'aux plus graves (ostéites, septicémies et même méningites). Toutes les voies d'introduction (orale, locale, injections intramusculaire, péritonéale et même intraveineuse) ont été utilisées selon les circonstances et les besoins.

Par le passé, les très nombreuses expérimentations animales comme l'administration thérapeutique ont montré l'innocuité de la phagothérapie.

Dans les années 1980, il a été rapporté une série de traitements d'infections ostéo-articulaires en échec thérapeutique [108]. Toujours en coopération multidisciplinaire (chirurgien, infectiologue et microbiologiste), les suspensions de bactériophages adaptés, préparées à l'Institut Pasteur, ont été appliquées localement pendant une huitaine de jours, d'abord directement sur le foyer infecté, puis par les drains laissés en place. Les résultats ont apporté très souvent et rapidement une guérison définitive de l'infection, suivie d'une consolidation osseuse. Il n'a pas été jugé nécessaire de communiquer les résultats dans la mesure où ces traitements étaient réalisés dans la lignée d'une tradition française de la phagothérapie [109].

S'il a été établi que les phages diffusent dans un organisme, ils sont éventuellement reconnus comme des intrus par les mécanismes de défenses du receveur. Il s'agit d'une reconnaissance dont les inconvénients (apparition

d'anticorps neutralisants et même de sensibilisation) sont faibles, plus théoriques que réels.

Dans les applications locales, généralement utilisées, le contact avec la bactérie pathogène est immédiat et massif et la guérison rapidement obtenue (**Figure 9**). Dans de telles conditions, il est rarement observé des réactions indésirables transitoires et bénignes, plus en rapport avec les impuretés des préparations qu'avec le bactériophage lui-même : fièvre, douleurs hépatiques.



Figure 9 : action locale d'un polymère biodégradable imprimé de bactériophages sous le nom « phagobioderm » [110].

Le spectre d'hôtes des bactériophages est étroit et le principal impératif de la phagothérapie impose un diagnostic bactériologique préalable soigneux avant tout traitement pour s'assurer par un test *in vitro* que le ou les phages sélectionnés sont actifs.

En outre, les utilisateurs aguérís recommandaient d'exalter la virulence de ces phages par des passages successifs sur la (ou les) souche(s) bactérienne(s) ciblée(s) [111;112].

b) Nouvelles tentatives :

Plus récemment, des expériences humaines ont été rapportées pour différents types d'infections : otites chroniques à pyocyaniques [113], ulcères [114], surinfections de brûlures [115;116], etc. L'une des dernières et des plus surprenantes est le traitement positif de prostatites chroniques par voie rectale [117]. Les résultats sont en relation avec la bonne diffusion des bactériophages dans certains tissus.

Après une abstention d'une quinzaine d'années, il s'est tourné vers les seuls producteurs actuels de bactériophages thérapeutiques : **la Russie** et **la Géorgie**, pays devenus facilement accessibles après la fin de la « guerre froide ». Une étude [118] in vitro des bactériophages produits par la firme russe **MicroGen**(avec comme produits vendus : les vaccins, les préparations immunobiologiques, les substituts d'industrie pharmaceutique, les bactériophages, des solutions pour infusion) a attesté de l'excellente activité des préparations anti-staphylococciques disponibles dans les pharmacies de Moscou.

Après quelques utilisations de cette préparation sur des infections locales (cicatrices, otite externe), rebelles aux traitements conventionnels malgré plusieurs tentatives, il a envisagé de prendre en charge des situations dramatiques (proposition d'amputation pour infections nosocomiales), voire vitales (infection des os du bassin). À titre compassionnel, des traitements ont permis d'obtenir des guérisons avec un recul aujourd'hui confortable [119]. Il y'a un an, des cas extrêmes (personnes très âgées) d'infections sur prothèse ostéo-articulaire (hanche et genou) ont été traités avec succès. . .

VII.3. Traitement de certaines maladies infectieuses :

La situation actuelle de la phagothérapie est bien différente de celle qui prévalait à ses débuts. En effet, les connaissances acquises, tant au laboratoire que dans la nature, sur les phages eux-mêmes et la relation avec leurs hôtes sont aujourd'hui très nombreuses. Toutes les données accumulées depuis des décennies assurent une meilleure approche et donnent l'opportunité de revoir la phagothérapie dans des conditions satisfaisantes. De nombreux modèles animaux sont aujourd'hui disponibles. Il est par conséquent facile de simuler toutes sortes d'infections bactériennes et de les traiter de manière à évaluer les résultats, par comparaison avec des groupes témoins. Le regain d'intérêt pour la phagothérapie est apparu aux alentours de l'année 2000. Les traitements expérimentaux par les bactériophages sont orientés par les besoins les plus urgents face aux bactéries pathogènes les plus préoccupantes ou les plus fréquemment rencontrées en milieu hospitalier: entérobactéries (*Escherichia coli*), mais aussi *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les travaux ne se limitent pas à ces trois agents infectieux dominants. D'autres seront rapidement abordés.

a) Traitement des infections à *Escherichia coli*

Ce n'est pas une surprise que les souches d'*E.coli* pathogènes soient celles les plus couramment concernées par des essais expérimentaux. D'une part, l'acquisition des connaissances sur ces bactéries et sur leurs phages est importante, et d'autre part, il s'agit de pathogènes très répandus aussi bien chez l'homme que dans le monde animal. Parmi les souches d'*E.coli*, le sérovar O157 : H7, a fait l'objet de deux études récentes, l'une sur le tractus intestinal de la souris et l'autre sur les ruminants[120;121].

Chez la souris, l'efficacité d'un mélange de trois phages a été évaluée. Deux jours après l'introduction d'une quantité identique de bactéries dans l'estomac, certaines souris furent traitées par une dose unique de phages tandis que d'autres l'étaient par une dose quotidienne pendant neuf jours. Les phages administrés de manière répétée sont beaucoup plus efficaces qu'en une seule fois. Cependant, s'il n'y a plus de bactéries dans le colon et la partie basse de l'intestin grêle, elles persistent dans la partie haute du grêle et dans le cæcum.

Dans la même étude, 24 heures après l'ingestion d'*E.coli*O157 : H7, deux autres phages toujours administrés per os, mais une fois par jour pendant trois jours chez la souris, éliminent complètement celle-ci à tous les niveaux y compris dans les fèces six jours après le début du traitement. En revanche, chez le veau, dans un modèle de portage rectal, les mêmes bactériophages n'ont pas été aussi efficaces. S'ils ont provoqué une diminution du nombre de bactéries introduites, leur élimination n'a pas été totale. Il apparaît donc que l'effet de la phagothérapie n'est pas le même selon les modèles utilisés.

Dans le premier, chez la souris infectée, les phages paraissent plus efficaces probablement parce que, après avoir éliminé une quantité des bactéries infectieuses, le système immunitaire prend le relais. Dans un modèle de portage, les phages seraient seuls à combattre les bactéries adaptées à leur hôte, le système immunitaire restant tolérant. Cette hypothèse a été confirmée par d'autres travaux chez le poulet [122].

Dans le tiers-monde, 27 % des diarrhées infantiles sont dues à *E.coli* et ne relèvent pas de l'immunisation active contrairement aux diarrhées d'origine virale. Au cours de la réunion qui s'est tenue à l'Institut Pasteur de Paris le 20 novembre 2007, Brüssow et al. [123] ont expliqué, quant à eux, leur objectif

d'utiliser des bactériophages du type T4 pour lutter contre ces diarrhées infantiles. À partir de selles récoltées à Dhaka, Bangladesh, endroit où l'on trouve le plus de diarrhées infantiles, il a isolé des phages T4 lytiques pour *E.coli* responsable de ces diarrhées. Une combinaison réduite de quelques-uns de ces phages a permis de lyser in vitro plus de 80 % des souches entéropathogènes d'*E.coli*, mais ils ne sont pas spécifiques de pathogènes et sont capables de lyser les souches commensales. In vivo, les bactériophages sont retrouvés dans les selles quelques heures plus tard : ces résultats chez l'homme ont été observés avec un de ces bactériophages T4 administré dans de l'eau de boisson. Ces phages passent dans l'estomac et l'intestin mais in vivo, les bactéries commensales n'ont pas été affectées par le traitement. Aucun symptôme ne fut noté pendant la durée du traitement.

Aucune trace de phage ne fut retrouvée dans le sang et aucune réponse immunitaire ne fut détectée. Ces observations encouragent à poursuivre l'objectif initial.

b) Traitement des infections à Staphylococcus aureus

S. aureus est un pathogène majeur responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales. Sa capacité à résister à de nombreux antibiotiques en fait un candidat privilégié pour la phagothérapie. Deux articles ont démontré que les phages protègent des souris contre une infection létale à *S. aureus*, aussi bien par voie intraveineuse que par voie intraperitonéale[124]. Plus la phagothérapie est précoce après l'infection, meilleur est le résultat. Toutefois, Capparelli et al. [125] ont montré qu'une infection chronique établie par voie intraveineuse peut être guérie après une injection unique de phages même après dix jours d'infection.

Il a été signalé encore, dans un autre article qu'un bactériophage fût ajouté à *une solution de Ringer* utilisée pour le nettoyage des mains [126] : il a rapporté que le nombre de staphylocoques diminue d'un facteur 100. Le bactériophage ajouté à une crème garde son efficacité. Ces essais, certes à très faible échelle, visent clairement à initier une phagoprophylaxie en milieu hospitalier afin de diminuer l'incidence des infections nosocomiales manuportées. Il existe également des projets d'étude pour éliminer le portage nasal de *S. aureus*. Gageons que l'application, avant une intervention chirurgicale, de quelques gouttes dans chaque narine sera mieux acceptée que celle de mupirocine. Avec le même objectif d'éliminer les germes nosocomiaux des établissements de soin, depuis quelques mois, l'hôpital : **Sacré-Cœur** de Montréal participe avec la firme canadienne : **Biophage Pharma** à une étude utilisant des bactériophages dirigés contre *S. aureus*.

Les expérimentations humaines récentes ou en cours en Europe sont très réduites. Des travaux en cours ont été présentés lors de la réunion qui s'est tenue à l'Institut Pasteur de Paris le 20 novembre 2007. Un essai témoin (semble-t-il le premier en pays de l'Ouest !) est conduit en Belgique par l'équipe de Zizi [127]. En cours depuis septembre 2007, il envisage de traiter 20 brûlés dont les plaies sont infectées par *S. aureus* et *P. aeruginosa*. La composition des suspensions de phages (deux clones antistaphylocoques et un clone antipseudomonas) a été adaptée pour être active sur les souches locales. Les résultats préliminaires sont encourageants. Une autre étude en Allemagne, exposée par Rakin [128]. Concerne les résultats positifs du traitement de neuf infections ostéoarticulaires chroniques à *S. aureus* multirésistantes aux antibiotiques par un produit appelé **DePhag**. (Figure 10)

1^{er} cas : traitement d'une ostéite chronique du pied



=====➔ Février 2005



=====➔ Juin 2008



=====➔ Juin 2009

Figure 10 : photos représentant l'efficacité d'intervention de la phagothérapie associée à l'antibiothérapie dans le traitement d'une ostéite chronique du pied [129].

Les résultats positifs, de cette dernière étude, sont à rapprocher de ceux de la dernière publication française sur ce sujet[130]. Au cours de la même réunion, il a été rapporté le cas d'un traitement d'une otite externe chronique (voir 2^{ème} cas: traitement d'une otite externe). C'est dans une des pharmacies de Moscou qui les vendent librement, qu'il s'est procuré des phages contre *S. aureus* pour traiter une otite rebelle[131].

2^{ème} cas: traitement d'une otite externe

Une jeune patiente a été examinée pour la première fois pour des séquelles d'otite chronique faisant suite à des épisodes d'otites à répétition traitées par des antibiotiques variés. Le spécialiste constatait une otorrhée et décidait de la traiter médicalement (**cefpodoxime et ofloxacin**) avant une intervention chirurgicale. La réparation de la membrane tympanique a été réalisée. Les suites immédiates ont été simples.

Trois mois plus tard, l'otorrhée est réapparue. L'examen a été très difficile en raison de douleurs locales très vives. Le tympan était devenu inflammatoire et humide. La reprise d'une antibiothérapie locale (**bacitracine**) permettait une atténuation des douleurs.

Pendant une année, la patiente a présenté plusieurs otorrhées traitées (**ofloxacin**). Lors d'une nouvelle consultation pour écoulement accompagné d'une douleur aiguë, sous anesthésie générale, un prélèvement a été fait mettant en évidence la présence en culture pure de *S. aureus* (**pénicilline R, méthicilline-R, erythromycine-R et ofloxacin-R**).

Malgré une antibithérapie prescrite immédiatement, l'écoulement et la douleur persistaient, le staphylocoque était encore isolé.

C'est alors qu'il a été décidé de pratiquer un examen plus précis et de faire de multiples prélèvements (membrane tympanique, revêtement cutané du conduit externe) avant l'application locale d'une suspension de bactériophages active in vitro, sur le germe, en association avec **la pristinamycine**.

Dans les 48 heures, la patiente a constaté une nette amélioration : arrêt de l'écoulement, et des douleurs. Les consultations ultérieures confirmaient l'évolution favorable : absence d'otorrhée et de douleur, disparition du staphylocoque. Le traitement a été arrêté, au bout de trois mois, l'examen de l'oreille était toujours très satisfaisant. [17].

c) Traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un autre pathogène opportuniste résistant aux antibiotiques qui provoque fréquemment des infections de la peau lésée. De tels sites infectieux sont directement accessibles à une application de bactériophages. Mais les bactériophages injectés par voie sous-cutanée, intraveineuse ou intrapéritonéale, sont aussi présents dans le sang, le foie et la rate. Chez la souris, un modèle d'infection cutanée sur blessure thermique, les bactériophages inoculés par voie intrapéritonéale protégeaient (80 % de survivants) des animaux infectés avec une dose létale de ***P. aeruginosa***[132].

Deux cas cliniques [133] d'infection à ***P. aeruginosa*** ont confirmé l'intérêt de la phagothérapie. Il s'agissait d'une otite chronique chez un chien et les multiples traitements antibiotiques n'en venaient pas à bout. Un autre cas est celui d'une surinfection chez une personne brûlée à 50 % chez laquelle il a fallu interrompre les greffes de peau. Dans les deux cas, l'infection a été guérie, permettant de stopper tout traitement antibiotique et de reprendre les greffes de peau.

Bien que relativement ancien, un article [134] relate une étude menée en Égypte sur 30 patients brûlés à divers degrés, surinfectés par *P. aeruginosa* et ayant été traités sans succès par tous les antibiotiques disponibles.

Un traitement par les bactériophages a permis d'obtenir une rémission totale dans 20 % des cas et une nette amélioration dans un peu plus de 40 % des cas. Les 40 % restants n'ont montré que peu ou pas d'amélioration. Les auteurs ont conclu que les bactériophages ne doivent pas être utilisés en routine pour tous les grands brûlés, mais réservés aux cas présentant une résistance aux antibiotiques. On ne peut souscrire à une telle recommandation qu'avec réserve.

d) Traitement des infections à *Mycobacterium tuberculosis*

Les espèces appartenant au genre *Mycobacterium* ont leurs propres phages (mycobactériophages). Mais comme les mycobactéries ont une multiplication intracellulaire, un phage thérapeutique doit franchir la membrane cellulaire puis survivre dans les macrophages. Cette stratégie a été empruntée à celle du cheval de Troie.

Certaines espèces de mycobactéries (*Mycobacterium smegmatis* ou *Mycobacterium kansasii*) ne sont pas (ou peu) pathogènes pour l'homme.

C'est en utilisant de telles mycobactéries que Broxmeyer et al. [135] ont eu l'idée d'utiliser un phage non lytique, qui produit des particules virales sans que son hôte soit lysé. Ces particules sont cependant lytiques pour *M. tuberculosis*. In vitro, une souche de *M. smegmatis* lysogénisée par un tel phage a été inoculée à une culture cellulaire contaminée par le bacille de la tuberculose. Après avoir été phagocyté, *M. smegmatis* libère des phages capables de lyser *M. tuberculosis*. À l'issue de ces expériences, les auteurs ont

réussi à éliminer toutes les souches de mycobactéries pathogènes intracellulaires. Si une telle stratégie s'avérait efficace in vivo, elle pourrait avoir un intérêt certain pour traiter les cas d'infection à germes à multiplication intracellulaire [136].

Toujours au cours de la réunion qui s'est tenue à l'Institut Pasteur de Paris le 20 novembre 2007, Bifani[137]a présenté un travail qui utilise les bactériophages, non pas pour traiter la tuberculose elle-même, mais pour diminuer son incidence en limitant sa transmission. Au cours du premier mois d'un traitement classique, *M. tuberculosis* persiste en grand nombre dans les poumons infectés. Des bactériophages en aérosols pourraient réduire le nombre global de bactéries et faire chuter le risque de contamination de l'entourage des malades. À partir de différentes sources, l'auteur a isolé un grand nombre de phages pour retenir ceux ayant un large spectre vis-à-vis de quelques souches cliniques de *M. tuberculosis*. Ayant ajouté à une culture de macrophages infectées par *M. tuberculosis*, un mélange de peptides (capables de pénétrer les cellules eucaryotes) et de ces phages, Bifani a montré que ceux-ci après avoir été phagocytés lysent le bacille tuberculeux.

L'auteur envisage de modifier le génome du phage pour qu'il puisse exprimer une protéine de capsid qui porterait ce peptide en espérant que celui-ci gardera ses propriétés de pénétration.

e) Traitement des infections à *Clostridium difficile* et *Bacillus anthracis*

Au Canada, les objectifs de Louis Charles Fortier sont d'isoler et de caractériser les phages de *C. difficile* afin d'approfondir les connaissances fondamentales sur ce groupe de phages méconnus.

Cela permettrait de mieux comprendre leur rôle dans la virulence et l'évolution de *C. difficile*. Si certains phages s'avéraient lytiques, ils pourraient en outre être utilisés en phagothérapie pour traiter la colite pseudomembraneuse et/ou les portages en collectivité. Plus anecdotique, peut-être, mais riche d'enseignement, la recherche sur le traitement de *B. anthracis* a été très intense ces dernières années.

Si la bactérie sporulante du charbon qui a sévi, par voie postale, aux États-Unis après les attentats du **11 septembre 2001**, peut être détruite par des antibiotiques classiques, certains redoutent que le bioterrorisme ne réussisse à mettre au point des souches résistantes aux antibiotiques.

C'est ainsi qu'une recherche a été entreprise pour combattre de telles souches. Schuch et al. [138] ont isolé une protéine, la lysine, qui détruit directement la bactérie mais aussi la spore qui est la forme du germe dans son usage en tant qu'arme bactériologique.

Plus largement, le potentiel médical de lysines bactériophagiques permet d'envisager des applications sous forme de vaporisateur nasal, non seulement contre une arme biologique mais aussi contre l'angine à *streptocoque A*, le *pneumocoque*, etc[139]...

Il est à noter que ce type d'enzymes n'est efficace que sur les bactéries à Gram positif [140]. Il est toutefois possible de distinguer deux situations. D'une part, les modèles d'infections par injection intraveineuse des bactéries, nécessitant une application rapide des bactériophages, et les modèles d'infections et de colonisation accessibles sans effraction. Si les modèles d'infection par voie intraveineuse ont l'avantage de démontrer que les

bactériophages sont efficaces in vivo, ils se révèlent assez limitant pour d'autres études.

En revanche, les modèles d'infection/colonisation présentent l'avantage de permettre des études sur des temps plus longs, mais ils ne se soldent pas toujours par l'éradication des bactéries. Il semble donc qu'il soit encore nécessaire de développer des modèles animaux, notamment d'infections chroniques, qui permettront de mieux appréhender l'efficacité des bactériophages dans des situations plus proches de celles pour lesquelles on envisage des traitements chez l'homme [131].

VII.4. Biotechnologie: les multiples applications du phage display

VII.4.1. Sélection de phages-substrats

L'équipe de Jim Wells (Genentech, CA, USA) a développé une approche astucieuse pour sélectionner des substrats de protéases [141]. Ils ont exprimé sur phage, de façon monovalente, des protéines de fusion tripartites qui possèdent un domaine amino-terminal capable de se fixer sur un support solide, suivi d'une séquence peptidique aléatoire (substrat potentiel de protéases), puis du domaine carboxy-terminal d'une protéine pIII à la surface du phage. Après fixation sur le support solide, les phages qui expriment les substrats potentiels sont traités par la protéase étudiée (la subtilisine ou le facteur Xa). Les phages qui exposent un peptide substrat sont alors libérés et amplifiés, alors que les phages qui exposent un peptide résistant à la protéolyse restent fixés (**figure 11**).

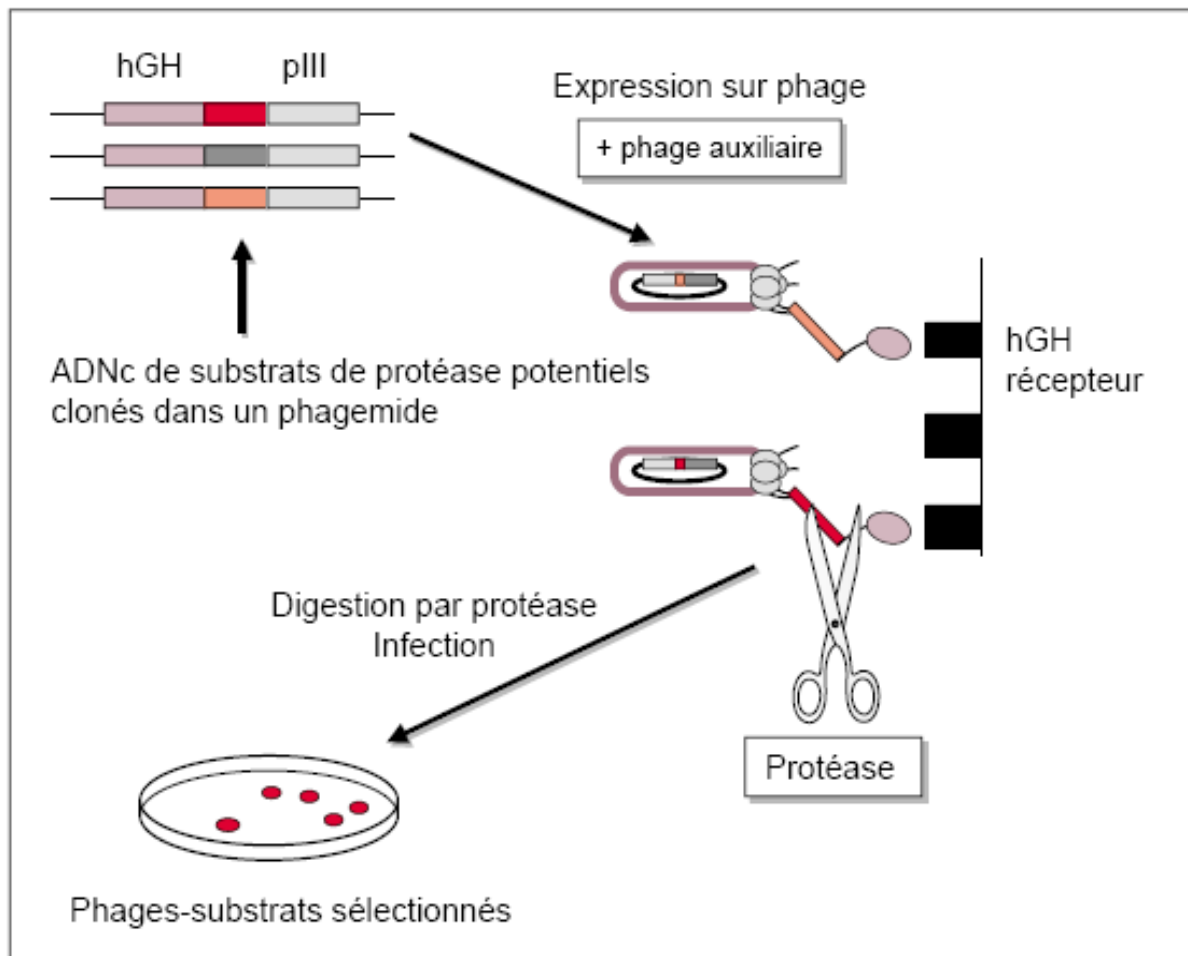


Figure 11 : Sélection de phages-substrats. Les phages monovalents codant pour des substrats potentiels fusionnés à l'hormone de croissance (hGH, humangrowth hormone), sont incubés avec le récepteur de l'hormone (hGH récepteur). Après traitement par la protéase d'intérêt, les phages porteurs de peptides substrats sont libérés et utilisés pour infecter des bactéries en phase exponentielle. Les phages sélectionnés peuvent éventuellement être amplifiés pour réaliser une nouvelle sélection [142].

Cette technique a également été appliquée à d'autres enzymes [143]...

VII.4.2. Immunisation

Par définition, les peptides isolés pour leur liaison à un anticorps peuvent présenter certaines propriétés d'anti-idiotypes telles que le pouvoir immunogène [144]. Il est parfois possible d'identifier des mimotopes qui ressemblent à l'antigène original, mais qui sont suffisamment dégénérés pour présenter différents spectres de réactions croisées. Par exemple, un mimotope sélectionné sur un anticorps spécifique d'un sous type du virus de l'hépatite B (HBV) a permis d'induire une réponse humorale anti-HBV non restreinte et donc plus protectrice. Il s'agit cependant de cas heureux car il arrive également que les anticorps dirigés contre des peptides mimotopes ne soient pas capables de reconnaître l'antigène original et, dans ce cas, les mimotopes injectés ne présentent aucun pouvoir protecteur. Le phage lui-même représente un excellent vecteur pour l'immunisation. Greenwood *et al.* (Cambridge, GB) ont exposé le peptide correspondant à l'antigène de surface majeur de *Plasmodium falciparum* à la surface de pVIII (protéine majeure de la capsid). Les phages porteurs de peptides injectés se sont avérés fortement immunogènes [145;146]. Il est possible d'imaginer la construction de phages « super immunogènes » présentant simultanément des épitopes B et T ainsi qu'une cytokine immunostimulante.

VII.4.3. Les banques combinatoires d'anticorps

Une application essentielle du phage filamenteux a été la construction de banques combinatoires de fragments d'anticorps [147]. Les domaines variables d'un anticorps peuvent être exprimés sur phage, soit sous forme de fragments scFv (seule chaîne Fv), dans lesquels les domaines VH et VL réarrangés sont liés de manière covalente par un court peptide, soit sous forme de fragments Fab.

Cette technique a permis d'obtenir de nombreux anticorps monoclonaux et s'est avérée particulièrement intéressante dans le cas d'anticorps humains pour lesquels les hybridomes sont techniquement et éthiquement difficiles à obtenir.

Le répertoire immunitaire naïf d'un animal (répertoire avant la rencontre avec les antigènes) contient des anticorps capables de se fixer sur la plupart des molécules avec des affinités modérées ($K_a \sim 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}$). Ce répertoire dérive du réarrangement combinatoire des différents gènes V dans les cellules souches (figure 12).

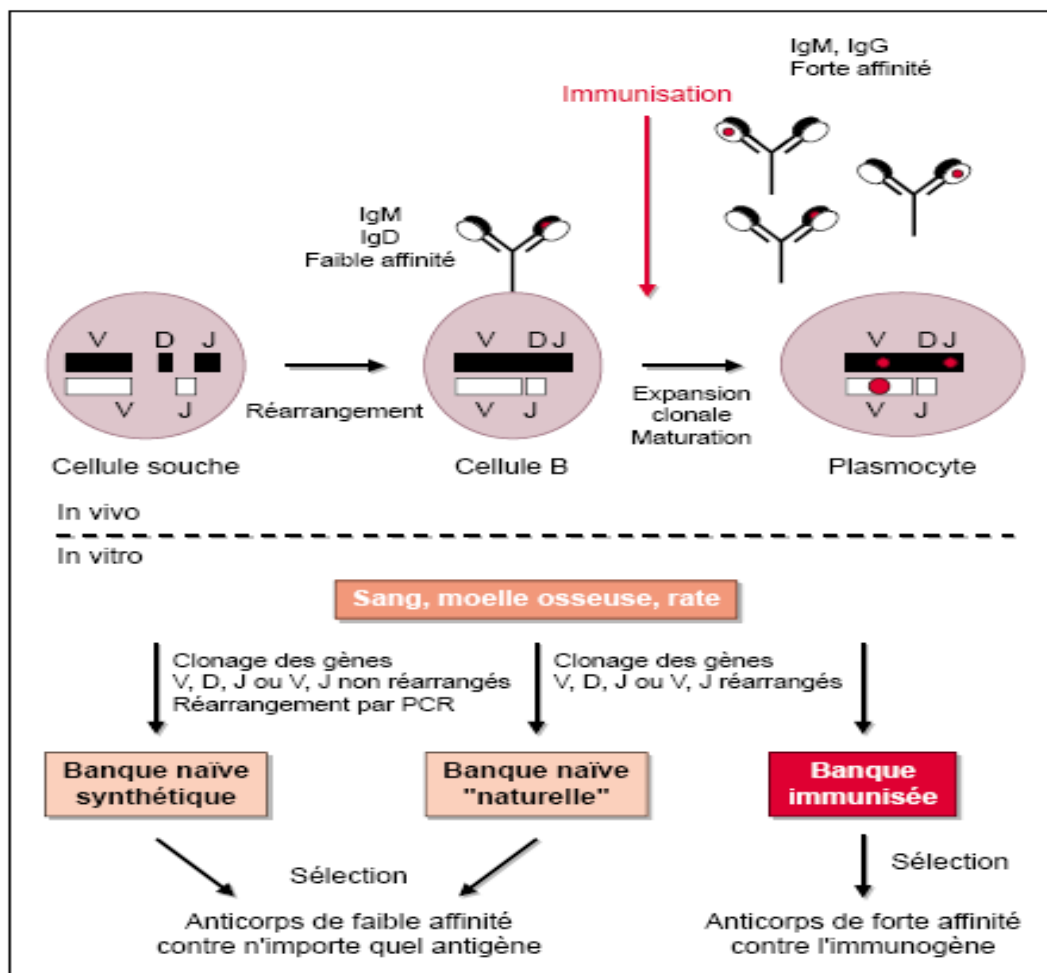


Figure 12 : Production d'anticorps.

In vivo, après réarrangement des différents gènes variables dans les cellules B, les anticorps naïfs sont exprimés en surface sous forme d'IgM et d'IgD. Après immunisation, les clones qui reconnaissent l'immunogène prolifèrent (expansion clonale) et se différencient en plasmocytes qui sécrètent les anticorps sous forme d'IgG (commutation de classe). Des mutations somatiques (représentées dans le schéma par des points rouges), s'accumulent dans les régions variables et conduisent, après sélection, à une augmentation de l'affinité des anticorps pour l'immunogène. Les banques combinatoires permettent de mimer ce processus in vitro [142].

Chaque cellule B ($\sim 10^8$ chez la souris et 10^{12} chez l'homme) exprime une seule combinaison VH et VL, qui résulte d'un réarrangement V-D-J pour la chaîne lourde et V-J pour la chaîne légère. L'immunisation induit la prolifération des cellules B qui reconnaissent l'immunogène, leur différenciation en plasmocytes et la sécrétion de l'anticorps correspondant. Une maturation de l'affinité des anticorps est effectuée par un processus de sélection d'hypermutations somatiques. C'est à ce stade que les cellules B sont généralement récoltées pour préparer les hybridomes. Les gènes réarrangés VH et VL des anticorps peuvent être amplifiés séparément par PCR, associés au hasard, puis clonés dans des phages permettant d'obtenir ainsi des banques combinatoires. Dans le cas de banques construites à partir d'une source « immunisée », des fragments d'anticorps de forte affinité pour l'immunogène peuvent être sélectionnés directement. Dans le cas de banques construites à partir du répertoire naïf, des anticorps d'affinité modérée peuvent être sélectionnés contre une grande variété d'antigènes sans recourir à l'immunisation [148]. Les banques combinatoires naïves dites naturelles, sont

construites à partir des gènes réarrangés VH (V-D-J) et VL (V-J) de l'animal. Les banques combinatoires naïves dites synthétiques, sont construites à partir des différents gènes (V, D, J) non réarrangés, leur réarrangement est réalisé *in vitro* par PCR.

L'infection combinatoire a permis d'obtenir des banques naïves de plus de 10^{10} fragments Fab différents présentant de bonnes affinités ($K_a \sim 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$) pour une très grande variété d'antigènes [149]. Bien des aspects du système immunitaire naturel sont donc ainsi copiés. Souvent, des processus de maturation *in vitro* doivent être appliqués pour obtenir les « meilleurs » anticorps en terme de spécificité et d'affinité. Les permutations de chaînes qui ont lieu durant le développement des cellules B peuvent être mimées *in vitro* par la technique de l'échange de chaînes (*chain shuffling*) dans laquelle une chaîne (VH ou VL) est gardée puis réassociée à toutes les autres chaînes de la banque [150]. La maturation de l'affinité est également assurée par introduction de mutations dans les CDR des fragments sélectionnés. Le système artificiel des banques combinatoires s'est donc avéré particulièrement intéressant pour toute production d'anticorps pour laquelle l'immunisation est difficile voire impossible.

Il est également utile pour l'étude du répertoire immunitaire de patients infectés par certains virus pathogènes ou de patients atteints de maladies auto-immunes [151]

CONCLUSION

La progression croissante de la multi-résistance réduit de plus en plus l'arsenal des molécules actives sur l'infection, ce que constitue une véritable menace face à l'antibiothérapie et peut aboutir au blocage thérapeutique.

Les exemples qu'on a vu précédemment, et qui renforcent notre conviction, n'ont pas la prétention de constituer des démonstrations irréfutables mais soulignent, devant l'urgence, qu'il pourrait y avoir des pistes à explorer. L'utilisation empirique ne saurait être généralisée car aucune règle ne vient encadrer la posologie, le rythme et la durée des traitements. Ils n'écartent pas les nécessaires études expérimentales, conduites selon les règles en vigueur, qui exigent généralement des essais en double insu comparativement à un groupe témoin.

Les connaissances nouvelles des phages seront sans aucun doute au cœur des recherches qui vont se développer dans les prochaines années et pourraient bouleverser la façon de traiter les maladies infectieuses.

L'appréciation de l'innocuité, l'efficacité et de la maîtrise des paramètres pharmacologiques, pour ne citer que ces points, demande que des procédures soient définies.

Pour l'innocuité, l'utilisation ancienne et en grand nombre de bactériophages naturels, tant en médecine humaine que vétérinaire, plaide pour une évaluation rapide. Pour des phages génétiquement modifiés, l'approche devra être plus prudente. L'efficacité imposera le choix d'un modèle dans lequel les conclusions seront claires.

En pharmacologie, il ne faudra pas compter sur les paramètres habituellement mesurés avec des produits chimiquement définis.

Toutefois, les deux principaux éléments qui manquent pour constituer des dossiers crédibles sont: les « médicaments » ayant une approbation BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) et une réglementation adaptée à l'utilisation de ces entités biologiques chez l'homme.

RESUME

Devant l'évolution inexorable des bactéries résistantes aux antibiotiques, il est devenu urgent de trouver des solutions viables. Le traitement par les bactériophages, ancienne thérapeutique antibactérienne, semblerait pouvoir apporter sa contribution dans la recherche de nouveaux moyens pour combattre les infections en échec.

Les bactériophages disposent d'un matériel génétique (ADN ou ARN), ce qui commande la machinerie de la cellule hôte, et par le biais de mutations sont capables d'attaquer et tuer les bactéries multi-résistantes par le simple principe lytique, présentant donc un grand avantage.

Des faits récents apportent des arguments nouveaux qui devraient pousser à mettre en valeur la phagothérapie et donc la revoir comme complément à l'antibiothérapie. Ce n'est pas une découverte mais aujourd'hui et plus que jamais, cette association doit être envisagée, et pas seulement si les bactéries sont résistantes aux antibiotiques.

La potentialisation des antibiotiques par les phages, la dégradation des biofilms qui protègent les bactéries persistantes, un éventuel blocage du système SOS des bactéries soumis à l'action des antibiotiques, sont autant de pistes qui méritent un intérêt.

Aujourd'hui, le contexte de la recherche médicale est bien différent de celui des débuts de la phagothérapie car elle est envisagée dans plusieurs applications, notamment la prophylaxie et le traitement des maladies infectieuses, en plus de la génétique et la biologie moléculaire, et donc constitue un outil de recherche à réévaluer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1].Campanaud J. Résistance aux antibiotiques : l'état d'urgence, *Science & Vie* n°1070, Novembre 2006 ; 52-50
- [2]. Dublanchet A ,Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie A short history of phage therapy / *Médecine et maladies infectieuses* 2008 ; 38 ; 420–415
- [3]. Dublanchet A, Patey O. La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure(s) pour une réhabilitation). *ImmunolBiolSpec* 2011 ; doi:10.1016/j.immbio.2011.06.001
- [4]. D'Herelle F . Le bactériophage et son comportement. Paris: Masson et Cie; 1926.
- [5]. D'Herelle F. Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysentérie bacillaire. *CR AcadSci*, Paris 1918;167; 970–2
- [6]. D'Herelle F. Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire. *CR AcadSci*, Paris 1919 ; 169; 932–3.
- [7]. D'Herelle F. Sur le microbe bactériophage. *CR AcadBiol* 1919 ; 82 ;1123–237
- [8]. Vezina R. La nouvelle vie de Félix d'Hérelle, *Interface*, volume 21, numéro 3, Mai - Juin 2000
- [9]. Kabeshima T. Thérapie expérimentale des porteurs de germes. *CR AcadSci*, Paris 1920 ; 170 ; 71.
- [10]. Kabeshima T. Sur le ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature du dit “microbe filtrant bactériophage” de d'Herelle. *CR AcadBiol* 1920 ; 83 ; 219–21.
- [11].Kabeshima T. Sur un ferment d'immunité bactériolysante.*CR AcadBiol* 1920;83 ;471-3
- [12].DublanchetA."La vraie vie de Félix d'Herelle avant la découverte du bactériophage", *Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur*, n° 175, 2003 ; 82-80
- [13]. Ruffat M. 175 ans d'industrie pharmaceutique française. Histoire de synthélabo. Paris: La Découverte; 1996.

- [14]. D'Herelle F. Le bactériophage dans ses relations avec l'immunité. *Medecine* 1936;17 ;20–11
- [15]. Sauvé L. Le bactériophage en chirurgie. Le bactériophage. Applications thérapeutiques. *Medecine* 1936;17 ; 54–49
- [16]. Chambon P. La filière géorgienne des virus qui soignent, *Science & Vie* n°1060, Janvier 2006 ; 117-106
- [17].Drouji S. Mise au point des bactériophages: caractéristiques et applications. Thèse de pharmacie, Faculté de Médecine et de pharmacie Rabat, 2009, N°: 69
- [18].<http://www.universalis.fr/encyclopedie/bacteriophages-phages/2-morphologie-et-structure/>
- [19].Ackermann HW. Phage classification and characterization. *Methods MolBiol* 2009;501;127—40.
- [20].Effantin G. Études par cryo-microscopie électronique de la structure de virus : application aux bactériophages Gifsy-2 de Salmonella Typhimuriumet T5 d'E.Coli. 23 novembre 2005.
- [21].Dokland T, Murialdo H. Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids 1993 ;233 ; 694-682.
- [22]. Conway JF, Duda RL , Cheng N, Hendrix RW, Steven AC. Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system 1995; 253; 99-86
- [23]. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution; 2003; 154, 251-245
- [24]. Caspar D L, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. 1962; 27, 24-1
- [25]. Baker T S, Olson N H, Fuller S D. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs 1999 ; 63; 922-862
- [26].Lurz R, Orlova EV, Gunther D, Dube P, Droge A, Weise F, Van Heel M, Tavares P. Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. 2001 ;310, 1037-1027

- [27].Ponchon L, Mangenot S, Boulanger P, Letellier L. Encapsidation and transfer of phage DNA into host cells: From in vivo to single particles studies. 2005 ;1724; 255-261
- [28]. Simpson A, Tao Y, Leiman P, Badasso MO, He Y, Jardine PJ, Olson N, Morais, M, Grimes S, Anderson D L, et al. Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. 2000; 408, 750-745
- [29].Guasch A, Pous J, Ibarra B, Ruth G, Valpuesta JM, Sousa N, Carrascosa J L,Coll M. (2002). Detailed architecture of a DNA translocating machine: the highresolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle. 2000; 315, 676-663
- [30].Valpuesta J M., Sousa N, Barthelemy I, Fernandez J J, Fujisawa H, Ibarra B, Carrascosa J L . Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector; 2000; 131;155-146
- [31].Agirrezabala X, Martin-Benito J, Valle M, Gonzalez JM., Valencia A, Valpuesta JM, Carrascosa JL. Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8A resolution: structural homologies of a basic component of a DNATranslocating machinery. 2005 ;347; 902-895
- [32]. Tang L, Marion WR, Cingolani G, Prevelige PE, Johnson JE. Threedimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. 2005; 24;2095-2087
- [33]. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. 2003; 154 ; 251-245
- [34]. Furukawa H, Kuroiwa T, Mizushima S. DNA injection during bacteriophage T4 infection of Escherichia coli.1983; 154: 938-945
- [35]. Muller M, Engel A, Aebi U. Structural and physicochemical analysis of the contractile MM phage tail and comparison with the bacteriophage T4 tail. 1994; 112;31-11
- [36].Guenebaut V, Maaloum M, Bonhivers M, Wepf R, Leonard K, Horber JK. TEM moire patterns explain STM images of bacteriophage T5 tails. 1997;69; 137-129
- [37].Kostyuchenko VA, Leiman PG, Chipman PR, Kanamaru S, van Raaij M J, Arisaka F, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG. Three-dimensional structure of bacteriophage T4 baseplate. 2003; 10; 693-688

- [38].Leiman PG, Chipman P R, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossmann M G. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. 2004; 118;419-42
- [39].Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. 2002; 415; 557-553.
- [40].Molineux IJ. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. 2001; 40; 8-1
- [41].Bohm J, Lambert O, Frangakis AS, Letellier L, Baumeister W, Rigaud JL. FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. 2001; 11; 1175-1168
- [42]. Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 2007;152;227—43.
- [43].http://www.Microbio/viro/phages/tp_t2_initiation-lysatuftp.odt JF Perrin maj 2008/2010/
- [44]. Jean-François VIEU, Bactériophages, EncyclopædiaUniversalis 2004 Multimédia
- [45]. Debarbieux L. La phagothérapie expérimentale à l'aube du xxie siècle Experimental phage therapy in the beginning of the 21st century, Médecine et maladies infectieuses 2008 ;38 ;421–425
- [46]. Dublanchet A, La phagothérapie au XXIe siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? doi:10.1016/j.antib.2008.08.002
- [47]. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International Journal of Antimicrobial Agents 30 ;2007; 118–128
- [48]. <http://alexandrevallet.free.fr/alex/avallet03/viro.html>
- [49]. Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL. Conway JF. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. 2005 ;15 ; 236-227
- [50]. Moore S D, Prevelige P E. Structural transformations accompanying the assembly of bacteriophage P22 portal protein rings in vitro. 2001; 276; 6788-6779
- [51].Agirrezabala X, Martin-Benito J, Valle M, Gonzalez J M, Valencia A, Valpuesta J M, Carrascosa J L. Structure of the connector of bacteriophage T7

at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. 2005 ;347; 902-895

[52].Orlova EV, Gowen B, Droge A, Stiege A, Weise F, Lurz R, van Heel M, Tavares P. Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy 2003 ;22; 1262-1255

[53]. Conway J F, Duda R L, Cheng N, Hendrix R W, Steven A C. Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. 1995 ;253, 99-86

[54].Hohn T, Flick H, Hohn B. Petit lambda, a family of particles from coliphage lambda infected cells. 1975; 98; 120-107

[55].Thuman-Commike P A, Greene B, Malinski J A., Burbea M , McGough A, Chiu W, Prevelige P E. Mechanism of scaffolding-directed virus assembly suggested by comparison of scaffolding-containing and scaffolding-lacking P22 procapsids. 1999; 76; 3277-3267

[56].Dokland T, Murialdo H. Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids. 1993; 233; 694-682

[57]. Zhang Z, Greene B, Thuman-Commike P A, Jakana J, Prevelige P E, King J, Chiu W. Visualization of the maturation transition in bacteriophage P22 by electron cryomicroscopy. 2000; 297; 626-615

[58].Morais M C, Tao Y, Olson N H, Grimes S, Jardine P J, Anderson D L, Baker T S, Rossmann M G. Cryoelectron-microscopy image reconstruction of symmetry mismatches in bacteriophage phi29. 2001; 135; 46-38

[59]. Fokine A, Chipman PR, Leiman P G, Mesyanzhinov V V, Rao V B, Rossmann M G. Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. 2004;101; 6008-6003

[60].Morais M C, Kanamaru S, Badasso M O, Koti J S, Owen B A, McMurray C T ,Anderson D L, Rossmann M G. Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. 2003;10; 572-57

[61].Duda RL, Hempel J, Michel H, Shabanowitz J, Hunt D, and Hendrix RW.Structural transitions during bacteriophage HK97 head assembly.1995 ; 247; 635-618.

[62]. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, RugerW.Bacteriophage T4 genome. 2003; 67; 156-86

- [63].Cerritelli ME, Conway J F, Cheng N, Trus B L, Steven A C. Molecular mechanisms in bacteriophage T7 procapsid assembly, maturation, and DNA containment. 2003; 64; 323- 301
- [64]. Fane BA, Prevelige P E. Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. 2003; 64; 299-259
- [65]. Simpson AA, Tao Y, Leiman P G, Badasso MO, He Y, Jardine PJ, Olson NH, Morais M C, Grimes S, Anderson DL. Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. 2000; 408 ; 750-745
- [66].Lata R, Conway JF, Cheng N, Duda R L, Hendrix RW, Wikoff WR, Johnson JE, Tsuruta H, Steven AC. Maturation dynamics of a viral capsid: visualization of transitional intermediate states. 2000; 100; 263-253
- [67]. Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL, Bustamante C. The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. 2001;413; 752-748
- [68].DoklandT,Murialdo H. Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids. 1993; 233; 694-682
- [69]. Yang F, Forrer P, Dauter Z, Conway JF, Cheng N, Cerritelli ME, Steven AC, Pluckthun A, Wlodawer A. Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. 2000; 7; 237-230
- [70]. Olson NH, Gingery M, Eiserling FA, and Baker TS. The structure of isometric capsids of bacteriophage T4. 2001; 279; 391-385
- [71].Duda RL. Protein chainmail: catenated protein in viral capsids. 1998; 94; 60-55
- [72].Gilakjan ZA, KropinskiAM. Cloning and analysis of the capsid morphogenesis genes of Pseudomonas aeruginosa bacteriophage D3: another example of protein chain mail? 1999;181; 7227-7221
- [73].Vadim V. Mesyanzhinov :bacteriophage T4 structure,Assembly, and initiation infection studied in three dimention, Elsevier Inc 2004;0065-3527
- [74].Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. 2002; 415;557–553
- [75]. King J. Assembly of the tail of bacteriophage T4. 1968; 32 ; 262–231

- [76]. Vianelli, A, Wang GR, Gingery M, Duda RL, Eiserling FA, Goldberg EB. Bacteriophage T4 self-assembly: Localization of gp3 and its role in determining tail length. *J. Bacteriol* 2000; 182:688–680
- [77]. Kikuchi Y, King J. Genetic control of bacteriophage T4 baseplate morphogenesis. III. Formation of the central plug and overall assembly pathway. 1975;99; 716- 695
- [78]. Zhao L, Kanamaru S, Chaidirek C, Arisaka F. P15 and P3, the tail completion proteins of bacteriophage T4, both form hexameric rings. *J. Bacteriol.* 2003; 185; 1700-1693
- [79]. Coombs DH, Arisaka F. T4 tail structure and function. In “Molecular Biology of Bacteriophage T4” (J. D. Karam, ed.). American Society for Microbiology, Washington, DC. 1994
- [80]. Dublanchet A. La phagothérapie au XXI^e siècle. Première partie :que pourrait-elle apporter aujourd’hui ? 2008 ; 218-209
- [81]. <http://www.tulane.edu/~biochem/lecture/601/nolan/genereg.htm>
- [82]. Friedman DI, Court DL. Bacteriophage lambda: Alive and well and still doing its thing. 2001;4 ;207–201
- [83]. Yu D, Ellis HM, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court D L. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000 ;97; 5983-5978
- [84]. Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. 2003; 6 ; 42-35
- [85]. Pearl S, Gabay C, Kishony R, Oppenheim A, Balaban NQ. Nongenetic individuality in the host—phage interaction. *PLoS Biol* 2008;6 ;120.
- [86]. Pierre TIOLLAIS, Génie génétique, Encyclopædia Universalis 2004 Multimédia
- [87]. <http://www.usherbrooke.ca/biologie/babillard/colber.pdf>
- [88]. <http://ancien.lepoint.fr/sciences/document.html?did=81892>
- [89]. Riedel GW. Alternatives: phage therapy: rediscovering a treatment for superbug infections. *Epoch Times* 2005

- [90].Fischetti VA. Phagothérapie : alternative à l'antibiothérapie ? Rev Fr Lab 2007;394;16.
- [91].Neter E, Clark P. The effects of penicillin on *Staphylococcus* bacteriophage. J Bacteriol 1944;48;261.
- [92].Himmelweit F. Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococci. Lancet 1945;246;104—5.
- [93].MacNeal WJ, Filak L, Blevins A. Conjoined action of penicillin and bacteriophages. J Lab Clin Med 1946;31;974—81.
- [94].Rountree PM. Staphylococcal bacteriophages. I. The effect of penicillin on staphylococcal bacteriophages. Aust J Exp Biol Med Sci 1947;25;9—15.
- [95]. Krueger AP, Cohn T, Smith PN, McGuire CD. Observations on the effect of penicillin on the reaction between phage and staphylococci. J Gen Physiol 1948;31;477—88.
- [96].Comeau AM, Tetart F, Trojet SN, Prere MF, Krisch HM. La « synergie phages-antibiotiques » : un enjeu pour la phagothérapie. Med Sci 2008;24;449—51.
- [97].Rolain JM, Francois P, Hernandez D, Bittar F, Richet H, et al. Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. Biol Direct 2009 ;4 ; 15-1
- [98]. Adams MH, Park BH. An enzyme produced by a phage-host cell system. II The properties of the polysaccharide depolymerase. Virology 1956;2;719—36.
- [99].Stirm S, Bessler W, Fehmel F, Freund-Molbert E. Bacteriophage particles with endo-glycosidase activity. J Virol 1971;8; 343—6.
- [100]. Lindberg AA. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. In: Sutherland IW, editor. Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. London: Academic Press; 1977; 356-289

- [101]. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology* 1998 ;144;3039—47.
- [102]. Bedi M, Verma V, Chhibber S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25;1145—51.
- [103]. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005;436;1171—5.
- [104]. Radman M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* 1975;5A;355—67.
- [105]. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106 ;4629—34.
- [106]. d'Herelle F. L'étude d'une maladie : le choléra, maladie à paradoxes. Lausanne: Rouge Éditions; 1946.
- [107]. Faruque SM, Johirul Islam MQS, Ahmed ASG, Faruque DA. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: role of host-mediated amplification of phage. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)* 2005;102 ;6119—24.
- [108]. Lang G, Kher P, Mathevon H, Clavert JM, Séjourné P, Pointu J. Bactériophages et chirurgie orthopédique - À propos de sept cas. *RevChirOrthopReparatriceAppar Mot* 1979;65 ;33—7.
- [109]. Raiga A. Considérations générales sur l'ostéomyélite aiguë et son traitement par le bactériophage de d'Hérelle. Paris: Congrès français de chirurgie.
- [110]. <http://invision.me.free.fr/>
- [111]. Nicolle P, Vieu JF. Actualité de la recherche médicale : recherches sur le bactériophage. I. Biologie et applications thérapeutiques actuelles. *Concours Med* 1966;88 ;487—94.

- [112].Vieu JF, Guillermet F, Minck R, Nicolle P. Données actuelles sur les applications thérapeutiques des bactériophages. Bull AcadNatl Med 1979;1 ;61—6.
- [113]. Wright A, Hawkins CH, Anggard 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.ClinOtolaryngol 2009;34; 349—57.
- [114]. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. J Wound Care 2009;18;237—43.
- [115]. Ahmad SI.Treatment of post-burns bacterial infections by bacteriophages, specifically ubiquitous *Pseudomonas* spp. notoriously resistant to antibiotics. Med Hypotheses 2002;58;327—31.
- [116].Merabishvili M, Pirnay JP, 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. PlosOne 2009;4(3);4944.
- [117].Letkiewicz S, Miedzybrodzki R, Klak M, Jonczyk E, Weber- Dabrowska B, Gorski A. The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis.FEMS Immunol Med Microbiol 2010;60 ; 112—99
- [118].Houssaye C. Évaluation in vitro d'une suspension de bactériophages anti-staphylococcique à usage thérapeutique. Thèse, faculté de médecine de la Pitié-Salpêtrière, Paris; 2004 ; N°579
- [119].Dublanchet A. Des virus pour combattre les infections. Lausanne (Suisse): Éditions Favre SA; 2009.
- [120]. Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. Appl Environ Microbiol 2006;72;5359–66
- [121].Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyanaga K, Nakai Y, Unno H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. J BiosciBioeng 2005;100; 280–7.

[122].Xie H, Zhuang X, Kong J, Ma G, Zhang H. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for Escherichia coli 3-1 caused diarrhea in chickens. J Gen Appl Microbiol 2005;51(3);159—63

[123].Brussow H. Development of a T4 bacteriophage cocktail for the treatment of Escherichia coli in children. Compte rendu de la journée « Infectiologie bactérienne » : quelle place pour la phagothérapie ? Institut Pasteur, Paris; 2007.

[124].Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T. Experimental protection of mice against lethal Staphylococcus aureus infection by novel bacteriophage phi MR11. J Infect Dis 2003;187(4);613—24.

[125].Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(8);2765—73.

[126]. O’Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. Appl Environ Microbiol 2005;71(4);1836—42.

[127].Zizi M. Évaluation of a phage cocktail in the treatment of burn wounds infected with Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus strains. Compte rendu de la journée Infectiologie bactérienne : quelle place pour la phagothérapie ? Institut Pasteur, Paris; 2007.

[128].Rakin A. Alternative treatment of chronic multiple resistant bacterial infections with a bacterial product. Compte rendu de la journée « Infectiologie bactérienne : quelle place pour la phagothérapie? » Institut Pasteur, Paris 20 novembre 2007.

[129]. <http://www.infectiologie.com/site/medias/JNI/JNI10/posters-affiches/JNI2010-Patey.pdf>

[130]. Lang G, et al. Bactériophages et chirurgie orthopédique. À propos de sept cas. RevChirOrthopReparatrAppar Mot 1979;65 ;33—7.

- [131].Dublanchet A. La phagothérapie au XXI^e siècle. Deuxième partie : expérience actuelle.2008 ; 10(4) ; 225-219
- [132]. McVay CS, Velasquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(6);1934—8.
- [133].Marza JA, Soothill JS, Boydell P, Collyns TA. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* 2006;32(5);644—6.
- [134].Abul-Hassan HS, El-Tahan K, Massoud B, Gomaa R. Bacteriophage therapy of *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Annals of the MBC* 1990;3(4):262.
- [135]. Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacón O, Wagner D, McGarvey J. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a *Mycobacteriophage* Delivered by a Nonvirulent *Mycobacterium*: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis* 2002;186;1155—60.
- [136].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* 2006;12; 6—1.
- [137].Bifani F. Selection and modifications of mycobacteriophages for therapeutic applications. *Compte rendu de la journée « Infectiologie bactérienne » : quelle place pour la phagothérapie ?* Institut Pasteur, Paris 20 novembre 2007.
- [138].Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nat Biotechnol* 2002;418; 884—8.
- [139].Fischetti VA. In: Kutter E, Sulakvelidze A, editors. The use of phage lytic enzymes to control bacterial infections in bacteriophages: biology and applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005; 321—34.
- [140].Yacoby I, Bar H, Benhar I. Targeted drug-carrying bacteriophages as antibacterial nanomedicines. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51 (6); 2156—63.

- [141].Matthews DJ, Goodman LJ, Gorman CM, Wells JA. A survey of furin substrate specificity using substrate phage display.*ProteinSci*1994 ; 3 ; 1197-205.
- [142]. Souriau C, The Duc Hua, Lefranc MP , Weill M , Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. m/s n° 3, vol. 14, mars 98
- [143].Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Galfre G, Pessi A, Tramontano A, Sollazzo M. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *CurrOpinBiotechnol*1995 ; 6 ; 80-73
- [144]. Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens.*J MolBiol*1991; 220; 821-7
- [145]. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology.*Annu Rev Immunol* 1994; 12 ; 433-55
- [146].Barbas CF III. Recent advances in phage display. *CurrOpinBiotechnol*1993; 4 ; 526-30.
- [147]. Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes JN, *etal.* Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* 1993; 12; 725-34
- [148].Hoogenboom H, Winter G. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged *in vitro*. *J MolBiol*1992; 227; 381-8
- [149]. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology.*Annu Rev Immunol* 1994; 12; 433-55
- [150].Barbas CF III, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, Cababa D, Jones TM, Williamson RA, Pilkington GR, *etal.* Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J MolBiol*1993; 230812-23
- [151]. Low NM, Holliger PH, Winter G. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J MolBiol*1996; 260; 359-68

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le président du jury

Vu :

Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par
délégation

Le Doyen