Des bactériophages naturels aux OGM

…

un siècle de phagothérapie

Alain DUBLANCHET

Séance penta-académique : antibiorésistance et société
13 juin 2018

PLAN

- DÉFINITIONS
  - ✓ bactériophage, phagothérapie et phagoprophylaxie
- BACTÉRIOPHAGE
  - ✓ histoire
  - ✓ dans la nature au laboratoire
- PHAGOTHÉRAPIE (phagoprophylaxie)
  - ✓ histoire
  - ✓ actualité

DEFINITIONS

- ✓ bactériophage

  mangeur de bactéries

- ✓ phagothérapie (bactériophagothérapie)

  utilisation thérapeutique de bactériophages

- ✓ phagoprophylaxie

  biocontrôle à l'aide de bactériophages

100 YEARS OF PHAGE continued...

9 JANUARY 2015

TRADEOFF between SURVIVAL and REPRODUCTION, i.e. at high temps.

- T1 doesn't age...

SURVIVAL and FECUNDITY...

- Phage do not pass on damage.

ctive, and grase.

ARE PHAGE immortal?

- You can use phage to EXPERIMENTALLY STUDY ANY EVOLUTIONARY or ECOLOGICAL PROCESS... ...including SEX and AGING...

- Bacteria age, but do phage age? AGING vs. REJUVENATION

- TRADEOFFS between and within GENERATIONS.

P22

"The DYNAMIC PROCESSES that BRING US these BEAUTIFUL STRUCTURES are still not WELL UNDERSTOOD!"

VIRUSES are MASTERS of GENETIC ECONOMY!

Thinking about STRUCTURES and the MATURATION of the VIRUS... as well as PROTEIN SCAFFOLDING.

"How do you INDUCE MU?"

2015: The "DEATH RAFT" model for HOLIN FUNCTION

MU in LYSOGEN: Repressed yet Exquisitely Poised for TRANSPOSITION

2013: Saha, Meng, Lou, and Hershey

2012: VIRAL TAGGING INTRODUCED...

1986: "A GENETIC SWITCH" published — Ptashne

Development of PCR — Mullis

BIAL P Thingstad

85: PHAGE SPLAY TECHNIQUE Smith

1983-86 PHAGE THERAPY in POLAND — Slopek

Evidence of MU eventually led to models for REPLICATIVE TRANSPOSITION.

1989: VIRUSES SOLVE the PROTIST PREDATION DEFICIT.

1989: HIGH ABUNDANCE of PHAGE in the ENVIRONMENT — Bergh, et al

1990: Concept of the VIRAL SHUNT — Frede Thingstad

HUGE PROGRESS in OBSERVATIONAL and EXPERIMENTAL WORK!

... but WE STILL HAVE MUCH TO LEARN about WHAT CONTROLS VIRAL ABUNDANCE!

TOP-DOWN CONTROL...

- Adaptation to resource competition
- Predator/prey

1990s

COST

DROP IN DNA SEQUENCING COSTS! More CAPABILITY, More DATA.

SHEEP TRIALS

2001: Isolation of phage CEV1

1997: First MICROARRAY of a COMPLETE EUKARYOTIC GENOME

2001: HUMAN GENOME SEQUENCED

2002: 10^31 VIRUSES in the WORLD!

2002: VIRAL METAGENOMES: High abundance of undiscovered sequences.

2006: MARINE VIRAL DIVERSITY REVEALED! — 60-80% remain unknown.

2007: HUMAN MICROBIOME PROJECT initiated

2003-PRESENT METAGENOMIC SAMPLING of HUMAN GUT reveals that the MAJORITY of DNA VIRUSES in gut are phage.

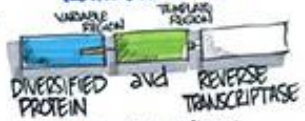
2000s

2010: FIRST SYNTHETIC GENOME CREATED!

- Complementarity...
- Multi-valency...

Adaptive to NON-PHAGE PROTEINS?

(DGR) DIVERSITY GENERATING RETROELEMENTS



- Changing patterns of receptors
- Major tropism determinant (Mtd)
- Adenine-specific variability
- New receptor specificity
- Surface complementarity

"How good is the FIT?"

- Binding strength
  - Affinity
  - Avidity

illustration by anthony weeks #weeksonian

MORE FROM FREDE THINGSTAD...

A seemingly trivial statement...

INDIVIDUALS per SPECIES = INDIVIDUALS per STRAIN summed over all ESTABLISHED STRAINS

Number of STRAINS is a COMPETITIVE ABILITY!

- Early state of the arms race — DOMINATED by IMMUNE STRAINS
- Mature state — SUSCEPTIBLE STRAINS

All strains able to grow faster than the dilution rate will establish.

Fast-growing competition strains → viral lysis

In an aquarium sea water sample, with PHAGE PRESENT, HEAT PRODUCTION MORE THAN DOUBLED!

FAST and WASTEFUL?

SLOW and EFFICIENT?

CONTROL THERMODYNAMICS: Limits to possible control of a physico-chemical system, given net effects.

DISSIPATION is "WASTED WORK"...

Each of the steps has to be equidistant in order to get minimum dissipation.

Sulfolobus spindle shaped viruses.

GEOTH ACID SPRIN

- Low
- Geo isol

illustration by anthony weeks #weeksonian

HISTOIRE

Quelques repères

- ✓ découverte des bactériophages
- ✓ début, essor et fin de la phagothérapie
- ✓ début de l'antibiothérapie
- ✓ âge d'or de l'antibiothérapie

- ✓ développement des résistances
- ✓ ère post antibiotiques ?
- ✓ recherche de solutions…

développement de la biologie moléculaire

expansion mondiale de la phagothérapie

renaissance de la phagothérapie

Pénicilline (Fleming) **1928**

CRISPR system anti-phage **2007**

Tbilisi (Eliava) **1924**

Laboratoire du Bactériophage **1933**

première synthèse (Craig Venter) **2003**

première séquence genome **1978**

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020

publication (Bruynoghe Maisin) **1922**

enzymes de restriction (Smith) **1970**

bactériophage (d'Hérelle) **1917**

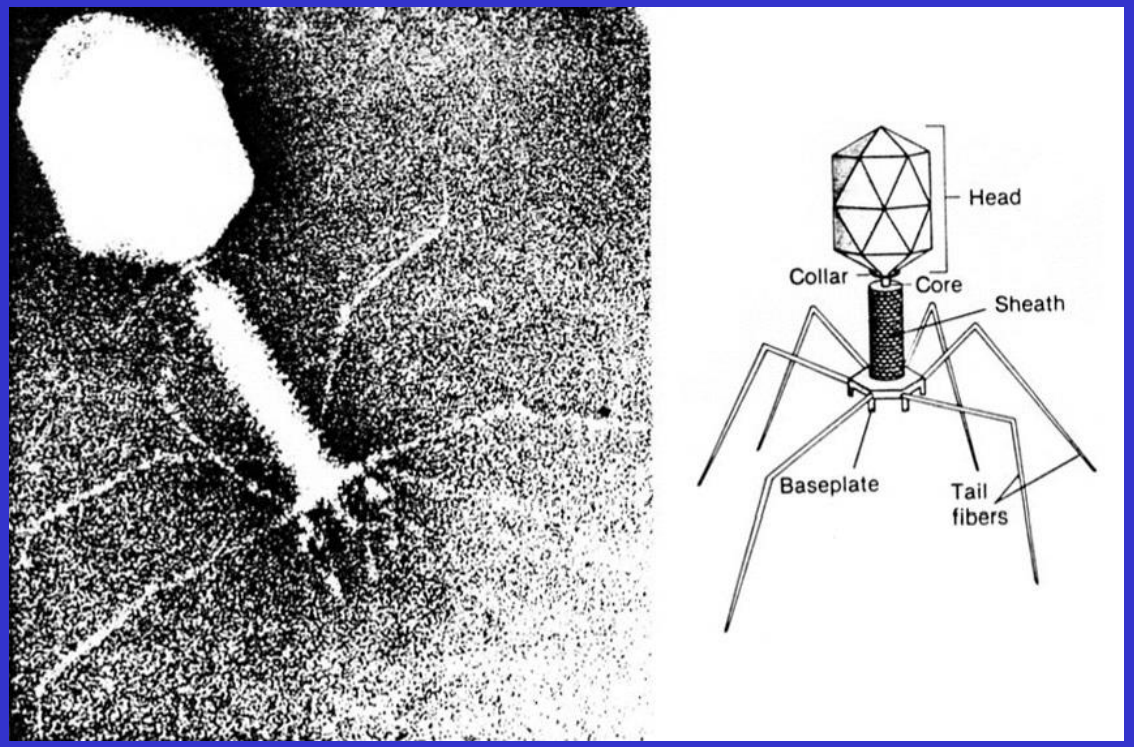
croissance en une étape (Ellis Delruck) **1939**

bactériophagie (Twort) **1915**

microscopie électronique (Ruska) **1941**

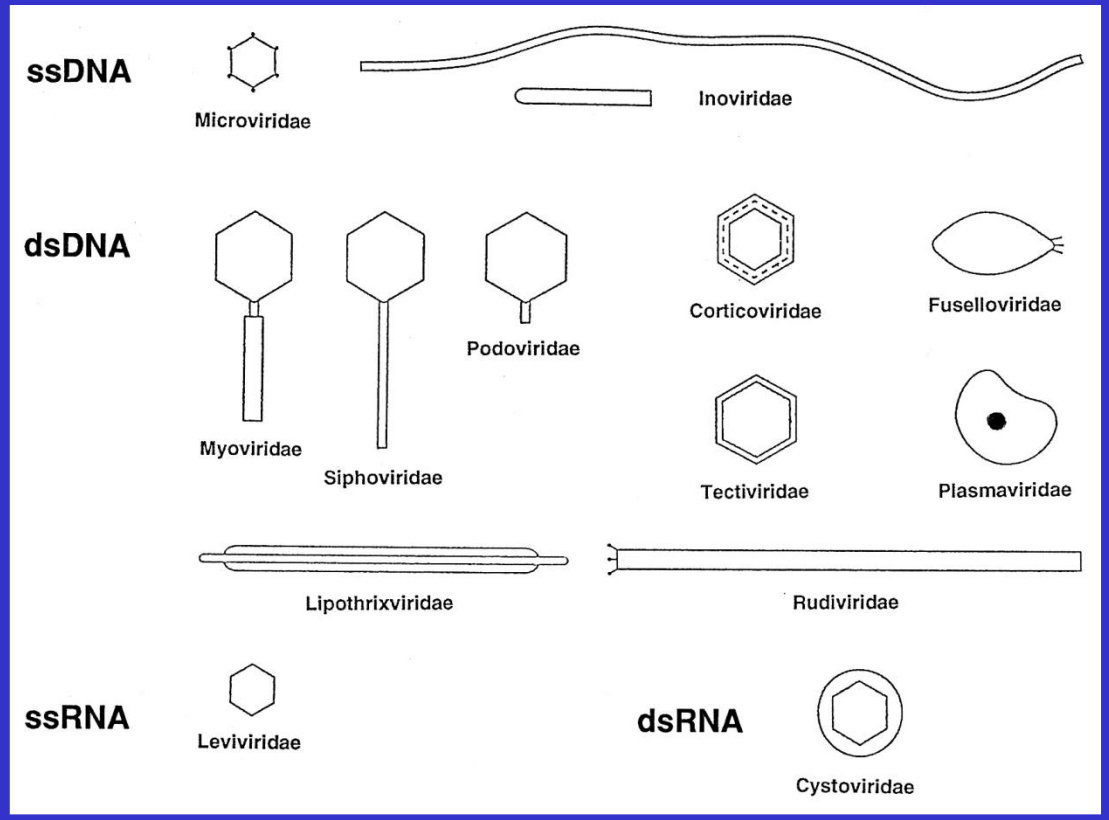
ferment destructeur (Gamaleya) **1898**

agent bactéricide filtrable (Hankin) **1896**

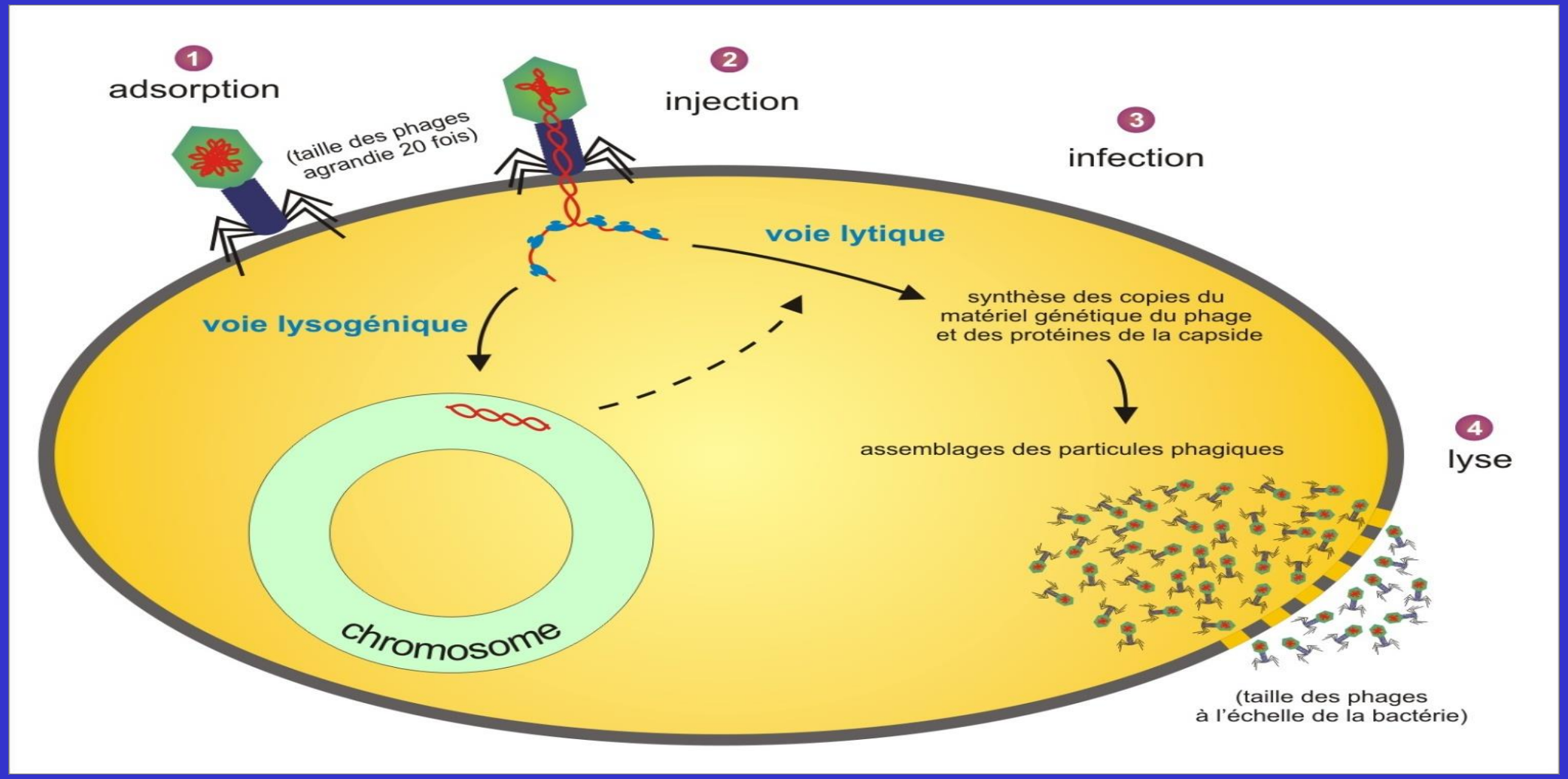


morphologie

classification



CYCLE LYTIQUE



Crédit photo : L. Debarbieux IPP

PHAGES DANS LA NATURE

- ✓ microécosystèmes
- ✓ partout où il y a des bactéries
- ✓ 10 à 100 fois plus nombreux

10^{32} bactériophages (<10% connus)

> **6 000 φ identifiés**

10^{31} bactéries (20% détruites/48-72 h)

- ✓ rôle écologique très important

MICRO-ÉCOSYSTEMES

- ✓ environnements naturels divers
- ✓ eaux, glace, terre, surfaces
- ✓ êtres vivants dès leur naissance
- ✓ peau, muqueuses, intestin

PHAGES AU LABORATOIRE

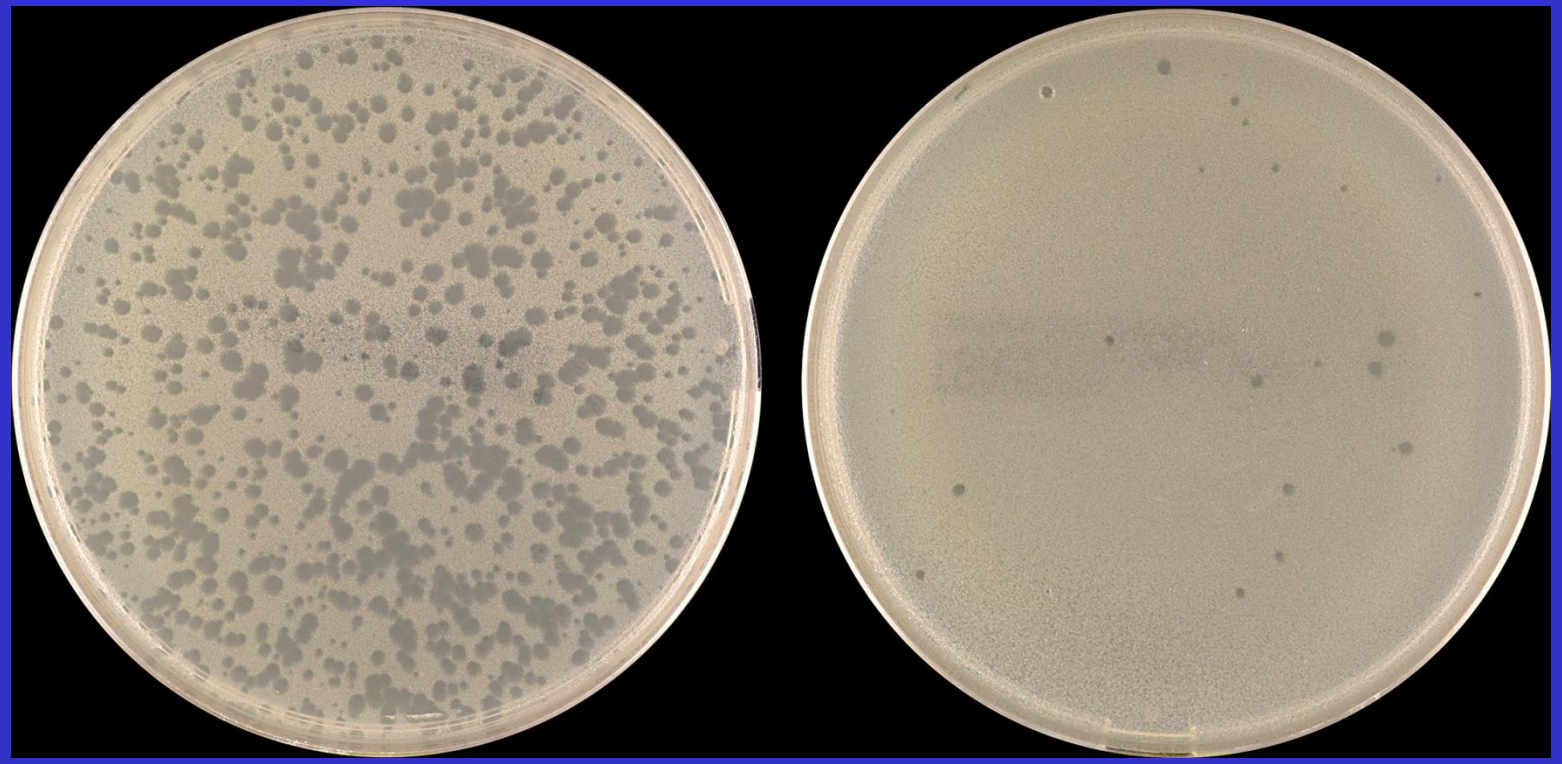
conditions requises

- ✓ échantillon d'eau
- ✓ bactérie pathogène
- ✓ matériel courant

étapes

- ✓ propagation - isolement
- ✓ purification - enrichissement
- ✓ numération - contrôles

METHODE DES PLAGES



QUELQUES ACQUIS EXPERIMENTAUX…

- **synergie avec…**
  - ✓ antibiotiques (Himmelweit, 1945)
  - ✓ inhibiteurs du QS (Mion, 2018)
- **connaissances**
  - ✓ dépolymérases (Adams & Park, 1956)
  - ✓ (endo)lysines (Jacob,1958)
  - ✓ activité immuno-modulatrice (Mills, 1962)
  - ✓ activité anti-biofilm (Lindberg,1977 ; Hughes 1998)
  - ✓ rôle des viromes dans les micro-écosystèmes
  - ✓ système de communication « *arbitrium* »(Erez, 2017)
- **développements technologiques**
  - ✓ purification des lysats
  - ✓ vectorisation (liposome, poudre, etc…)
  - ✓ modification/adaptation des bactériophages

applications
avec
les bactériophages

clinique

phagothérapie

biomarqueurs

étude des
microbiomes

vectorisation
vaccins - médicaments

surfaces
décontamination

biocontrol

élevage

agriculture

alimentation

destruction
biofilms

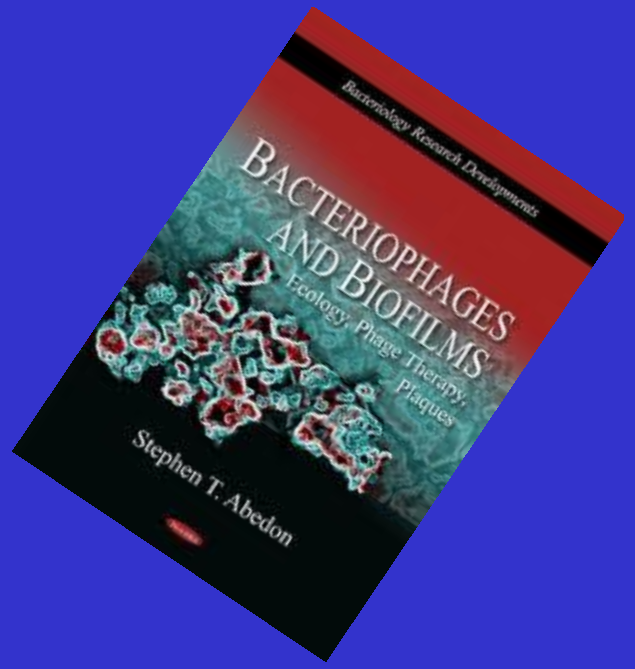
D’après Hill, C.; Mills, S.; Ross, R.P. Phages & antibiotic resistance: are the most abundant entities on earth ready for a comeback? Future Microbiol. 2018

EFFETS COMPLÉMENTAIRES

synergie possible avec des antibiotiques

action de certains phages sur les biofilms

Abedon ST. 2011



activité immuno-modulatrice et effets anti-inflammatoires

Gorski A. et al. *Phage therapy: beyond antibacterial action*. Front Med (Lausanne) 2018

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

PREMIER MINISTRE

Centre d'analyse stratégique

Novembre 2012
n° 299
LA NOTE D'ANALYSE

Questions sociales
Développement durable

Les bactéries résistantes aux antibiotiques

PROPOSITIONS

1. Promouvoir la coordination par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) d'un réseau mondial de surveillance et d'alerte des bactéries multi-résistantes.
2. Rationaliser les prescriptions d'antibiotiques chez l'homme :
   - en envoyant chaque année à tous les médecins leur profil de prescription d'antibiotiques ;
   - en soutenant la création de centres interrégionaux de conseil en antibiothérapie et en renforçant le rôle du médecin antibioréférent à l'hôpital ;
   - en encourageant la recherche de nouveaux tests rapides d'orientation diagnostique.
3. Réduire drastiquement la consommation d'antibiotiques critiques pour l'homme chez l'animal, soit par des engagements volontaires de l'ensemble des filières, soit par des interdictions réglementaires.
4. Développer notre arsenal thérapeutique :
   - en renforçant les aides publiques à la recherche sur le long terme de nouveaux antibactériens et de moyens de prévention des infections ;
   - en clarifiant le statut réglementaire de la phagothérapie et en mettant en place un programme de recherche afin d'évaluer son potentiel thérapeutique.

www.strategie.gouv.fr

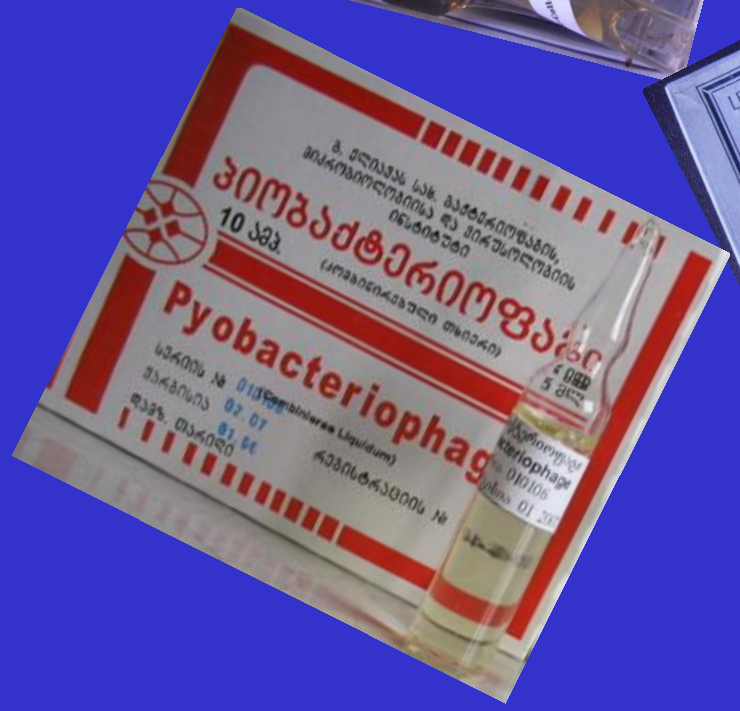
PROPOSITIONS

- Thérapeutiques anciennes
- Thérapeutiques nouvelles dites « alternatives »
  - ✓ vaccination
  - ✓ inhibiteurs du QS (virulence, biofilm), de la pompe à efflux, etc…
  - ✓ probiotiques, enzybiotiques, etc…
  - ✓ peptides anti-microbiens
  - ✓ anti-adhésines et anti-biofilms
  - ✓ certains médicaments : statines, diclofénac
  - ✓ transfert de flore … intestinale, vaginale, …
  - ✓ etc…
- **PHAGOTHÉRAPIE**

PHAGOTHÉRAPIE

- ✓ premières utilisations
- ✓ expansion et commercialisation
- ✓ découverte des antibiotiques
- ✓ éclipse de la phagothérapie
- ✓ résistance des bactéries
- ✓ renouveau ?

SITUATION ancienne



- ✓ **préparations artisanales**

- ✓ Eli Lilly and Company
- ✓ Swan Myers (Abbot Laboratories)
- ✓ Squibb and sons (B. M. S.)
- ✓ Laboratoire Parke-Davis (Pfizer)
- ✓ German company Antipiol
  - ✓ Saphal en Suisse ➔ années **60**
  - ✓ Lab. du Bactériophage ➔ années **70**
  - ✓ I. P. Pasteur de Paris et Lyon ➔ **80**
    - ✓ **Géorgie -Russie -Pologne**

PHAGES THERAPEUTIQUES

Origine → **« naturel »**
« entrainé » (autophage)
« modifié »

Préparation → **« commerciale »**
« hospitalière »

Spécificité → **« cocktail »**

PURIFICATION & CONTROLES

- élimination des endotoxines (centrifugation, Endotrap®)
- contrôle de stérilité, pyrogénicité, etc…
- étude de la toxicité
- étude de la morphologie (M.E.)
- séquençage (identification, gènes, etc…)

…

- présentation (cocktail) – conditionnement – conservation, etc…

critères de BPF (GMP) → labélisation

PRÉPARATIONS actuelles

- vétérinaire — Delmont laboratories (Staphage®)
- agro-alimentaire — OmniLytics (Agriphage™)
  Intralytics (ListShield™, Salmo Shield™, etc...)
  Micreos/PhageGuard (ListexP100, Samonelex, etc…)
- médical — Russie (MicroGen) (cosmétiques ; probiotiques)
  Pologne (sur place)
  Géorgie (Eliava, Biochimpharm)

Quelques spécialités médicales

… mais aussi quelques probiotiques … et produits d'hygiène

USA →

Floraphage
Prephage
Probiophage (en essai clinique ?

Russie →

Microcosm «Phagogin» for intimate hygiene «Otophag»
(gel for treating ENT infections),
Fagodent, Fagoderm
Foodphage

UTILISATION actuelle

- ✓ **jusqu'en1990**

  utilisation de préparations de l'Institut Pasteur
  cas « désespérés » en chirurgie orthopédique

- ✓ **à partir de 2004**

  utilisation de préparations étrangères (Russie – Géorgie)
  tourisme médical (Géorgie)
  cas en échec thérapeutique

- ✓ **depuis 2017**

  utilisation de préparations françaises (Pherecydes Pharma)
  cas de risque majeur fonctionnel ou vital

UTILISATION actuelle

- ✓ essais expérimentaux
- ✓ impasses thérapeutiques
- ✓ absence de réglementation adaptée
- ✓ non disponibilité de suspensions

de la prise en charge « compassionnelle »
à l'ATU ?
…. au tourisme médical

PERSPECTIVES

- définir **statut juridique** du bactériophage thérapeutique
- produire des phages thérapeutiques aux **normes *GMP***
- utiliser des **modèles expérimentaux**, selon des protocoles rigoureux et standardisés
- entreprendre des **études cliniques** selon les normes modernes
- créer **centre(s) de phagothérapie** (structure hospitalière)
  - entretenir une collection de phages
  - fabriquer des suspensions « sur mesure »
  - prise en charge pluridisciplinaire

CONCLUSION

- ✓ **service écosystémique**
- ✓ **« One Health »**
- ✓ **médecine de précision ?**
- ✓ **complément** et non **alternative**

Articles récents recommandés

Articles

- ✓ Barr JJ. *A bacteriophages journey through the human body*. Immunol. Rev. 2017
- ✓ Gorski A. et al. *Phage therapy: beyond antibacterial action*. Front Med. 2018

- ✓ Numéro special : *Hurdles for phage therapy (PT) to become a reality*. Viruses 2018

Livres

- ✓ Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M.; Lavigne, R. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. Vol III. Humana Press 2018
- ✓ Azeredo, J., Sillankorva, S. *Bacteriophage therapy : from lab to clinical practice*. Humana Press 2018