

PLACE DE LA PHAGOTHERAPIE DANS LE TRAITEMENT DES INFECTIONS OSTEOARTICULAIRES BACTERIENNES



Journée Scientifique
du CRIOGO

RENNES 15 OCTOBRE 2015

**Dr O.PATEY et Dr A.DUBLANCHET
CHI Villeneuve Saint Georges**

PHAGOTHERAPIE

DEFINITIONS

PHAGO: phages ou bactériophages; virus spécifiques des bactéries

THERAPIE: traitements; ces traitements peuvent être curatifs ou préventifs

PHAGOTHERAPIE: traitement des infections bactériennes par les bactériophages

Acide nucléique/ADN

Tête/Capside

Gaine contractile

Collier

Fibres caudales

Plaque basale

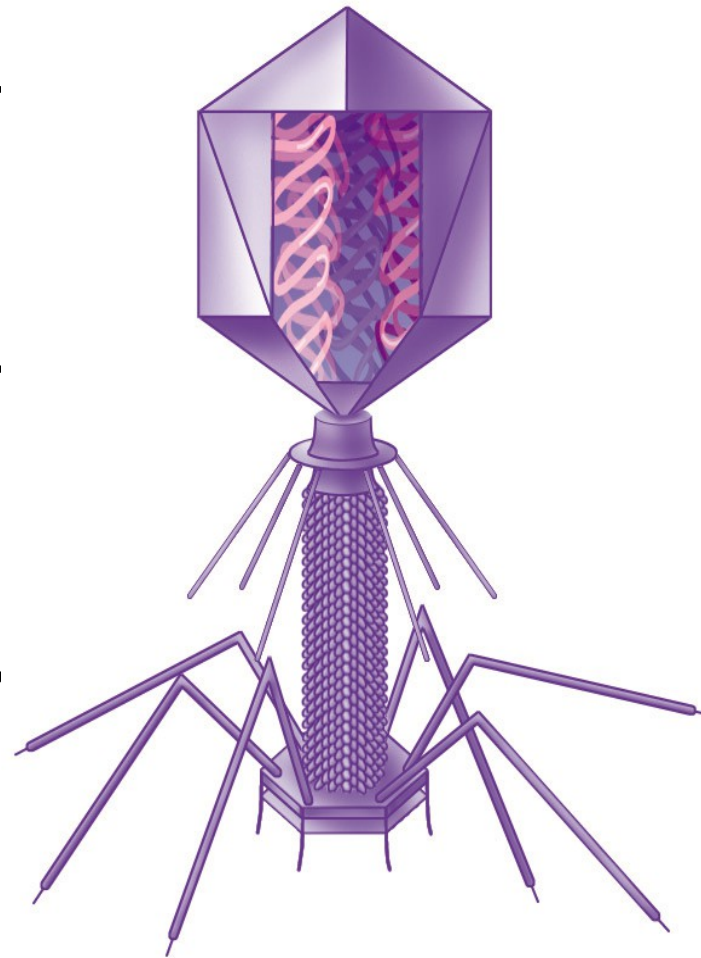


Schéma 1 Représentation d'un bactériophage de type T4

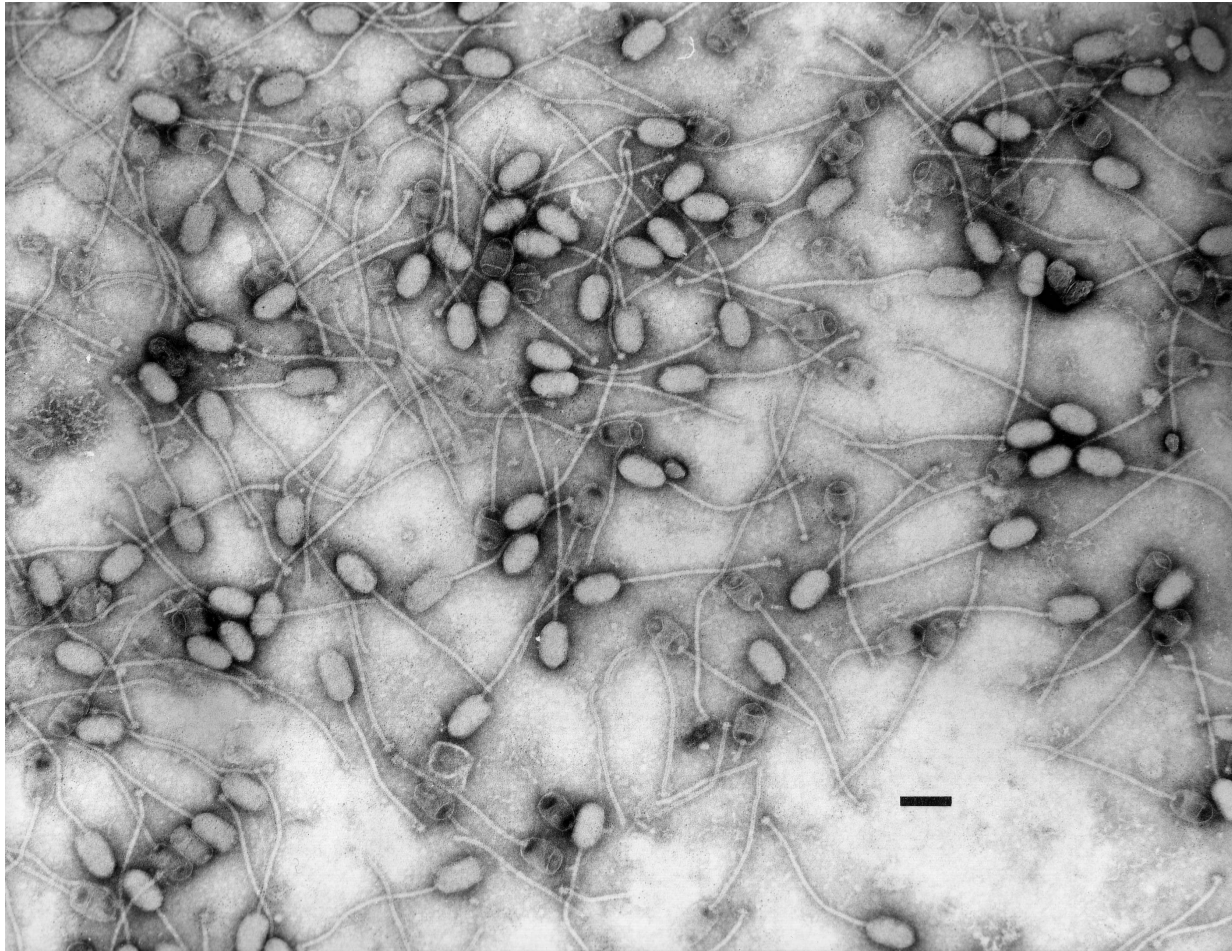


Photo 1 : Bactériophage 3A de Staphylococcus aureus
(Microscopie électronique ; coloration : acétate d'uranyl ; grossissement : x 92 400)
Cliché H.W. Ackermann

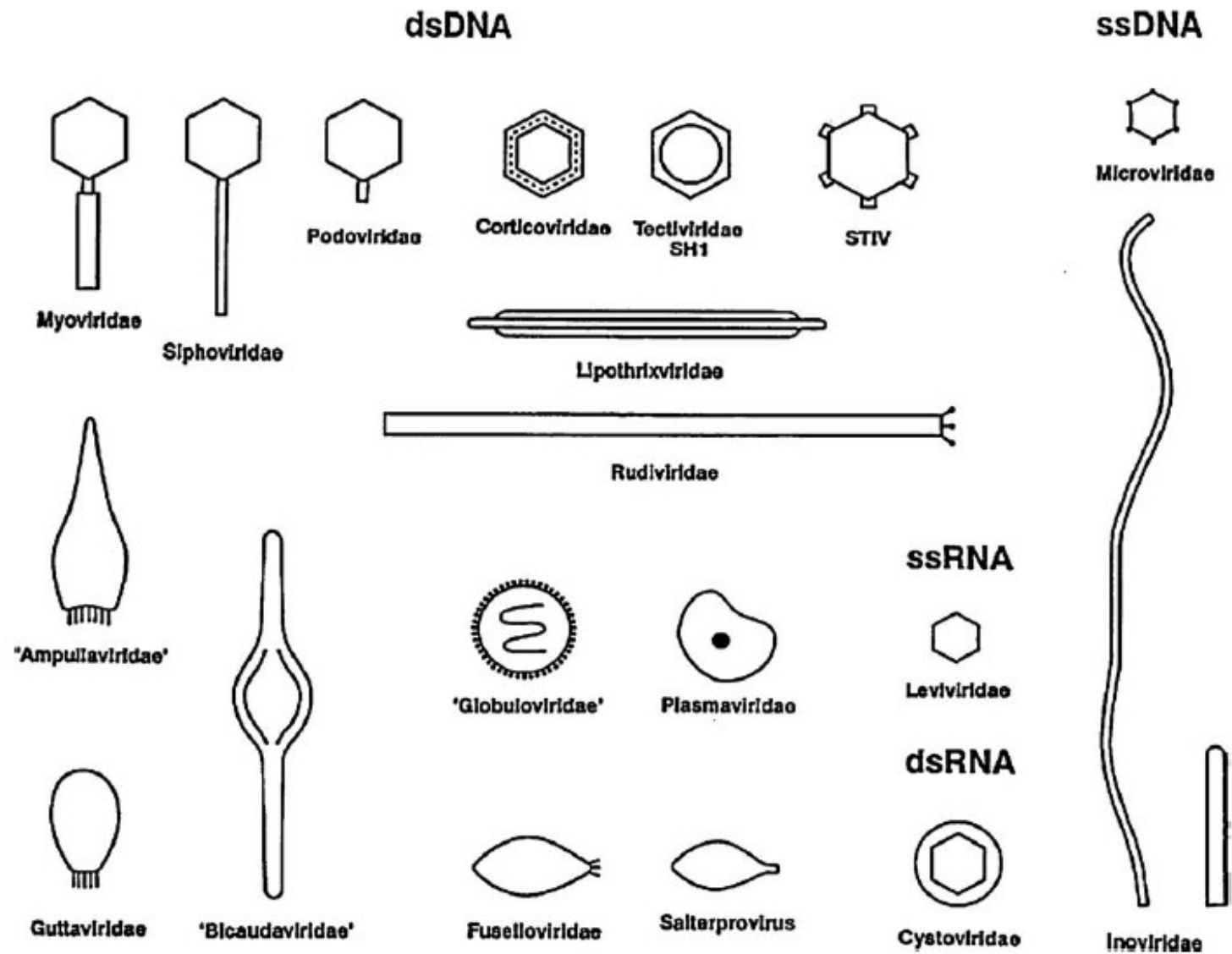


Figure 2 Morphologie des principaux groupes de bactériophages. D'après et avec autorisation de H.W. Ackermann [77].



Première mondiale : Pherecydes Pharma lance une étude clinique multicentrique de phagothérapie chez les grands brûlés

C'est la première fois qu'un essai clinique aux standards de l'industrie évalue la tolérance et l'efficacité des phages pour lutter contre les infections sensibles et résistantes aux antibiotiques

Romainville, France, le 9 septembre 2015 – Pherecydes Pharma, société biotechnologique



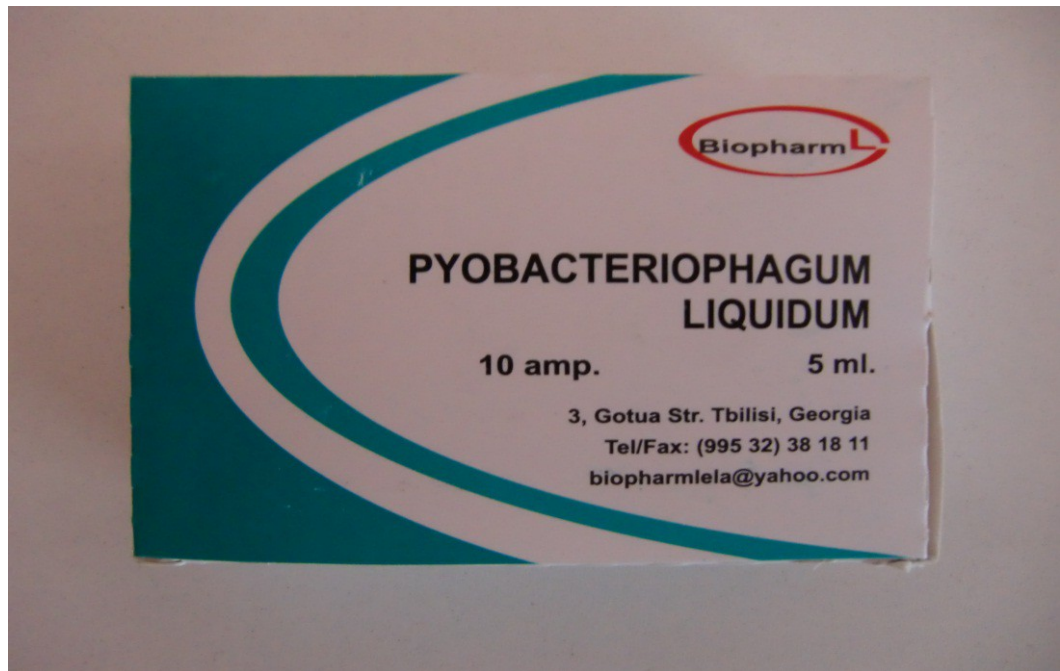
Votre vie,
notre combat



MINISTÈRE
DE LA DÉFENSE

PP0121 AND PP1131

- **PP0121:** Mix of 13 lytic phages lytiques against *Escherichia coli*
- **PP1131:** Mix of 12 lytic phages lytiques against *Pseudomonas aeruginosa*

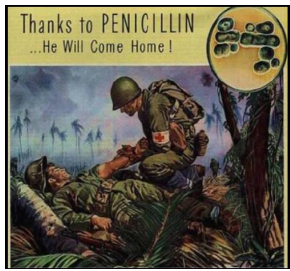


PHAGES FORMULATIONS

Hankin observed *V. cholerae* antibacterial activity in Indian river water (1896)



Bacteriophages characterized and named by d' Hérelle (1917)



Use of phages as molecular biology tools begins (1950s) and continues to present day



Phage genome sequencing begins (1980s) and continues to present day

1890 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2010



antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)



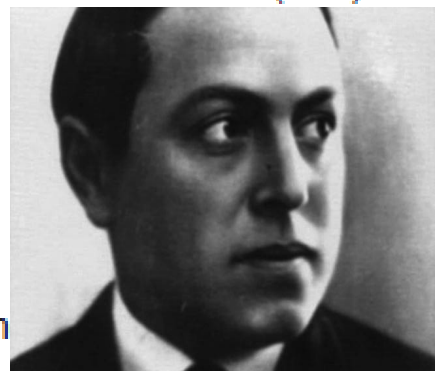
Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)

Major timelines in the history of phage therapy



Anciennes fioles contenant des phages à visée thérapeutique. [B]

Phage institute set up in Tbilisi, Georgia (1923)



Phage lambda (λ) isolated (1951)

Animal studies of Smith and Huggins revitalize phage therapy research in West (1980s)

Fischetti's group demonstrate in vivo activity of phage lysins (2001)

Phage cocktail for biocontrol of *Listeria* in ready-to-eat meats approved by FDA (2006)



L'ACTION BACTÉRICIDE DES EAUX DE LA JUNNA ET DU GANGE SUR LE MICROBE DU CHOLÉRA

PAR M. E. HANKIN

Du laboratoire du gouvernement, Agra, Inde.

Quand on voit, à la traversée du Gange ou de la Jumna, au milieu d'une des grandes villes indiennes, des milliers d'habitants se laver, eux, leurs troupeaux et leurs vêtements dans une eau trouble et sale, et quand on songe que fréquemment des cadavres à moitié brûlés trouvent leur dernier asile dans le fleuve, on est bien excusable de penser que ces eaux doivent être dangereuses à consommer, et que la vénération des Hindous pour leur fleuve sacré prouve leur ignorance de toute idée de santé ou de propreté. C'est ce que pensent les autorités européennes, et, en ce qui concerne la distribution du choléra, elles considèrent volontiers le Gange comme le principal agent de la transmission de la maladie dans son pays d'origine, et comme le père nourricier de son microbe.

Un simple examen microscopique des eaux de ces deux fleuves révèle pourtant une remarquable différence avec les eaux des fleuves européens ayant le même degré de trouble. On trouve dans ces dernières des débris végétaux et animaux abondants, beaucoup de microbes et de formes vivantes végétales et animales. L'eau du Gange ou de la Jumna ne présente au contraire aucune trace de matières organiques, à moins qu'elle ne soit recueillie au voisinage d'un *bathing ghât* (lieu de baignades) au-dessous de la ville. Le limon emporté par le fleuve est presque exclusivement du sable ou du mica. L'examen bactériologique prouve que les microbes sont beaucoup plus rares que dans des rivières européennes de même importance. Nos rivières sont

1. Sur les microbes des rivières de l'Inde. Communication au congrès médical indien tenu en décembre 1894.

Hankin published his observations in 1896 in the annals of the Institut Pasteur – that was the first evidence of the presence of bacteriophages in water and their antibacterial activities.

It was a viral-like agent with antibacterial properties. It was temperature sensitive and capable of passing through a porcelain filter, and it could reduce titres of the bacterium *Vibrio cholerae* in laboratory cultures.



"L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera," *Annales de l'Institut Pasteur* (in French) 1896; 10: 511-523.

In 1915 The Lancet published an article written by Frederick Twort about "the transmissible bacterial lyses". It was the first publication on bacteriophages.



stomach is explored manually up to the cardiac orifice, feeling for the induration around the perforated ulcer. Failing to find an ulcer on the anterior surface the stomach is pulled out with the transverse colon, and its posterior surface explored through an incision in the mesocolon.

A perforation is seldom of more than a quarter of an inch in diameter, though occasionally twice as large as this, and can be firmly occluded by the passage of one or two sutures. These sutures should secure a good wide grip through the whole thickness of the organ, since a small grip will easily tear out of the soft edematous wall. The occluded ulcer should be invaginated where possible by a series of interrupted sutures taking up the serous and muscular coats. Invagination of the ulcer may, however, prove impossible if the ulcer and area of surrounding induration are very large, or in some instances where the ulcer is at the attachment of the duodenum to the posterior wall. In such cases the occluded ulcer is covered with a graft of detached omentum, or drainage is made down to the ulcer with a gauze pack (Corner¹) in case the preliminary sutures cut out.

One must next consider whether a gastro-jejunostomy should be done. In most cases where the patient is not likely to die shortly we finish with a gastro-jejunostomy, especially where the ulcer is in the vicinity of the pylorus, since if this be done the patient can be fed after operation much more effectively, and there can be little doubt that many of these patients are suffering from malnutrition, the results of previous dyspepsia, which prevents healing taking place readily. This addition does not add greatly to the duration of the operation (the whole procedure from start to finish averages, we find, about 35 minutes) and improves the prospects of ultimate success. In the less usual cases where the ulcer is on the body of the stomach gastro-enterostomy is not so urgently needed, but nevertheless is advisable.

The Use of Jejunostomy.

Where the patient's condition is extremely grave and every moment spent on the operation is of importance, we advise simply occluding the ulcer with one or two sutures, placing a gauze drain down to the site of perforation, and performing a jejunostomy for the purpose of feeding the patient early. Jejunostomy is performed on the invagination (Kister) principle, takes less than five minutes to perform, and has the advantage that fluid nourishment can be introduced to the most absorbent surface of the intestinal canal, in a situation where vomiting is impossible, and which, unlike the rectum, is unable to reject the proffered refreshment. The actual results of cases treated by this method were less good than were those of cases treated otherwise simply owing to the very grave condition of the patients; 1 recovered and 3 died. One of the latter, which had been perforated three days, lived four days after operation. Another lived

¹ THE LANCET, Jan. 10th, 1914, p. 101.

Saiger and jejunostomy } 1 ... 2 0 ... 1

My best thanks are due to my house surgeons for their notes on the above cases, and especially to Mr. W. S. Ferrin, surgical registrar to the London Hospital, for his care in collecting and collating the histories.

WIMBORNE, W.

AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES.¹

By F. W. TWORT, L.R.C.P. LOND., M.R.C.S.

(From the Laboratories of the Brown Institution, London.)

DURING the past three years a considerable number of experiments have been carried out at the Brown Institution on filter-passing viruses. Many of these, previous to the outbreak of the war, were performed by Dr. C. O. Twort, and, unfortunately, circumstances during the present year have made it difficult to continue the work.

In the first instance attempts were made to demonstrate the presence of non-pathogenic filter-passing viruses. As is well known, in the case of ordinary bacteria for every pathogenic micro-organism discovered many non-pathogenic varieties of the same type have been found in nature, and it seems highly probable that the same rule will be found to hold good in the case of ultra-microscopic viruses. It is difficult, however, to obtain proof of their existence, as pathogenicity is the only evidence we have at the present time of the presence of an ultra-microscopic virus. On the other hand, it seems probable that if non-pathogenic varieties exist in nature these should be more easily cultivated than the pathogenic varieties; accordingly, attempts to cultivate these from such materials as soil, dung, grass, hay, straw, and water from ponds were made on specially prepared media. Several hundred media were tested. It is impossible to describe all these in detail, but generally agar, egg, or serum was used as a basis, and to these varying quantities of certain chemicals or extracts of fungi, acids, &c., were added. The material to be tested for viruses was covered with water and incubated at 37° C. or over for varying periods of time, then passed through a Berkefeld filter, and the filtrate inoculated on the different media. In these experiments a few ordinary bacteria, especially sporing types, were often found to pass through the filter; but in no case was it possible to obtain a growth of a true filter-passing virus.

Attempts were also made to infect such animals as rabbits and guinea-pigs by inoculating two doses of the filtered material, or by rubbing this into the abraded skin. In other cases inoculations were made directly from one animal to another in the

¹ This investigation was made on behalf of the Local Government Board.

Felix d'Herelle

- ✓ In 1917 Félix d'Herelle isolated first bacteriophages from the stools of patients recovering from dysentery*.
- ✓ He supposed that bacteriophages were agents that cause natural recoveries*.
- ✓ He showed that bacteriophages could be used to treat bacterial infections in humans*.
- ✓ Bacteriophages have been used in medicine since 1919, ten years before the discovery of the penicillin – the first antibiotic*.



Felix d'Herelle at a bacteriophage research center.

.Thacker PD. (2003) *Set a microbe to kill a microbe: drug resistance renews interest in phage therapy.* JAMA;290(24):3183-5.

MICROBIOLOGIE. — *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.* Note (°) de M. F. D'HERELLE, présentée par M. Roux.

L'isolement du microbe anti-Shiga est simple : on ensemence un tube de bouillon avec quatre à cinq gouttes de selles, on place à l'étuve à 37° pendant 18 heures puis on filtre à la bougie Chamberland L₂. Une petite quantité d'un filtrat actif ajoutée, soit à une culture en bouillon de bacilles de Shiga, soit à une émulsion de ces bacilles dans du bouillon ou même dans de l'eau physiologique, provoque l'arrêt de la culture, la mort des bacilles puis leur lyse qui est complète après un laps de temps variant de quelques heures à quelques jours suivant l'abondance plus ou moins grande de la culture et la quantité de filtrat ajoutée.

Le microbe invisible cultive dans la culture lysée de Shiga car une trace de ce liquide, reportée dans une nouvelle culture de Shiga, reproduit le même phénomène avec la même intensité : j'ai effectué jusqu'à ce jour, avec la première souche isolée, plus de 50 réensemencements successifs. L'expérience suivante donne d'ailleurs la preuve visible que l'action antagoniste est produite par un germe vivant : si l'on ajoute à une culture de Shiga une dilution d'une culture précédente lysée, de façon que la culture de Shiga n'en contienne qu'un millionième environ, et si, immédiatement après, on étale sur gélose inclinée une gouttelette de cette culture on obtient, après incubation, une couche de bacilles dysentériques présentant un certain nombre de cercles d'environ 1^{mm} de diamètre, où la culture est nulle; ces points ne peuvent représenter que des colonies du microbe antagoniste : une substance chimique ne pourrait se concentrer sur des points définis. En opérant sur des quantités mesurées, j'ai pu voir qu'une

En résumé, chez certains convalescents de dysenterie, j'ai constaté que la disparition du bacille dysentérique coïncidait avec l'apparition d'un microbe invisible doué de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille pathogène. Ce microbe, véritable microbe d'immunité, est un bactériophage obligatoire; son parasitisme est strictement spécifique, mais s'il est limité à une espèce à un moment donné, il peut s'exercer tour à tour sur divers germes par accoutumance. Il semble donc que dans la dysenterie bacillaire, à côté d'une immunité antitoxique homologue, émanant directement de l'organisme du sujet atteint, il existe une immunité antimicrobienne hétérologue produite par un microorganisme antagoniste. Il est probable que ce phénomène n'est pas spécial à la dysenterie, mais qu'il est d'un ordre plus général car j'ai pu constater des faits semblables, quoique moins accentués, dans deux cas de fièvre paratyphoïde.

BULLETIN OF THE NEW YORK ACADEMY OF MEDICINE

VOL. VII

MAY, 1931

No. 5

ANNUAL GRADUATE FORTNIGHT
**BACTERIOPHAGE AS A TREATMENT IN ACUTE
MEDICAL AND SURGICAL INFECTIONS***

F. d'HERELLE

**Professor of Bacteriology,
Yale University School of Medicine**

Hankin observed *V. cholerae* antibacterial activity in Indian river water (1896)



Bacteriophages characterized and named by d' Hérelle (1917)



Use of phages as molecular biology tools begins (1950s) and continues to present day



Phage genome sequencing begins (1980s) and continues to present day

1890 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2010



antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)

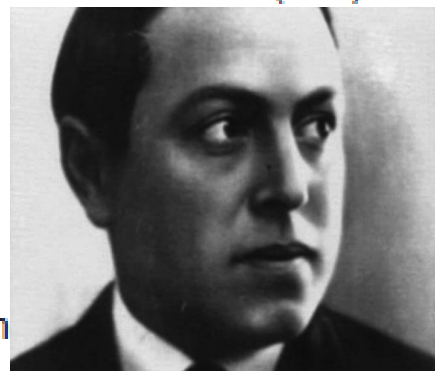


Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)



Anciennes fioles contenant des phages à visée thérapeutique. [B]

Phage institute set up in Tbilisi, Georgia (1923)



Phage lambda (λ) isolated (1951)

Animal studies of Smith and Huggins revitalize phage therapy research in West (1980s)

Fischetti's group demonstrate in vivo activity of phage lysins (2001)

Phage cocktail for biocontrol of *Listeria* in ready-to-eat meats approved by FDA (2006)



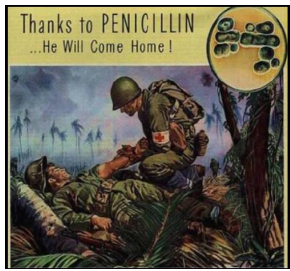
Major timelines in the history of phage therapy.



Hankin observed *V. cholerae* antibacterial activity in Indian river water (1896)



Bacteriophages characterized and named by d' Hérelle (1917)



Use of phages as molecular biology tools begins (1950s) and continues to present day



Phage genome sequencing begins (1980s) and continues to present day

1890 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2010



Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)



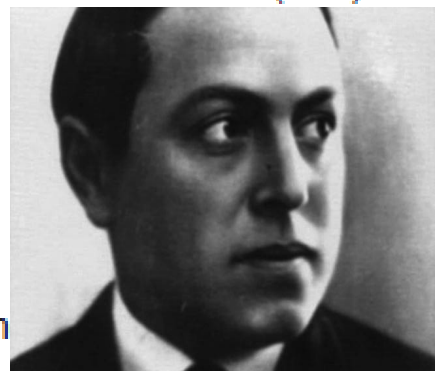
Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)

Major timelines in the history of phage therapy



Anciennes fioles contenant des phages à visée thérapeutique. [B]

Phage institute set up in Tbilisi, Georgia (1923)



Phage lambda (λ) isolated (1951)

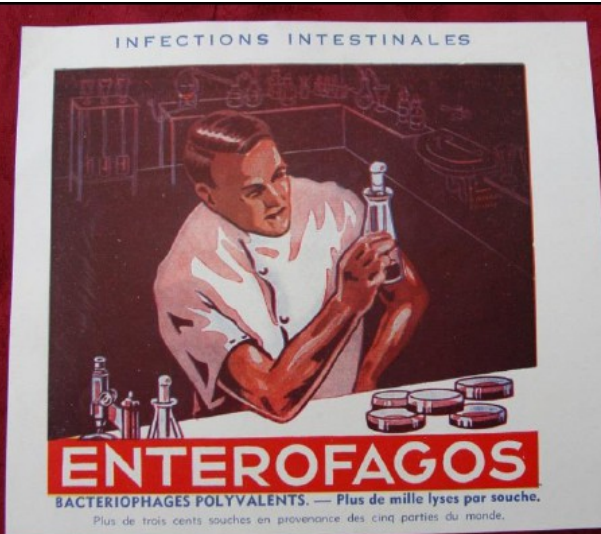
Animal studies of Smith and Huggins revitalize phage therapy research in West (1980s)

Fischetti's group demonstrate in vivo activity of phage lysins (2001)

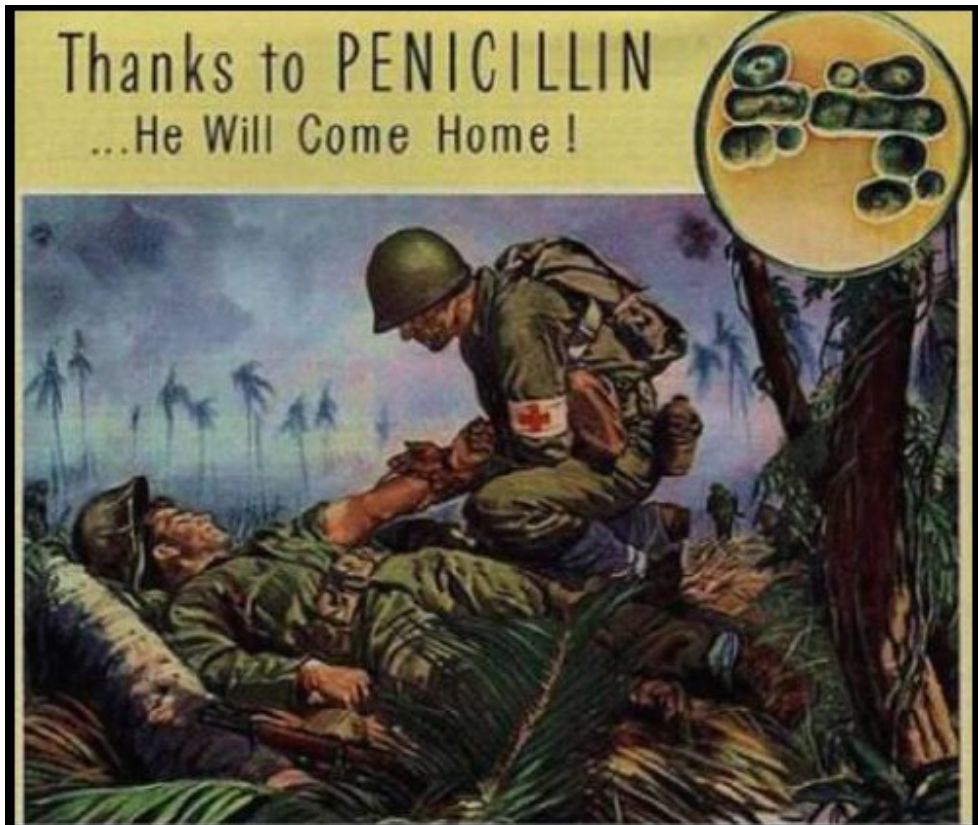
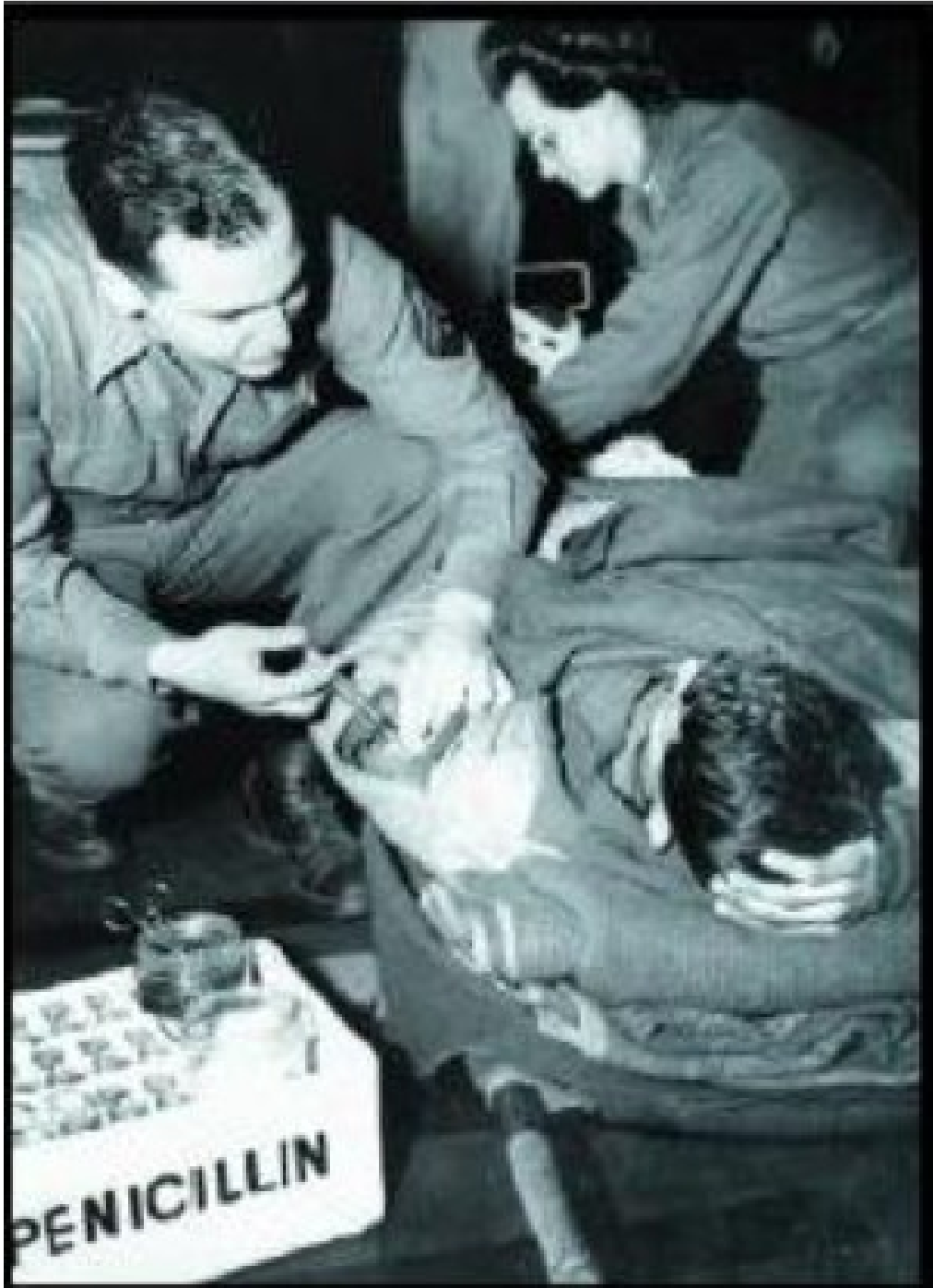
Phage cocktail for biocontrol of *Listeria* in ready-to-eat meats approved by FDA (2006)



Au sein de l'Union soviétique et des forces de l'Axe, les bactériophages ne furent pas mis tout de suite de côté, l'antibiothérapie n'étant au début de la seconde guerre mondiale que balbutiante. Allemands, Japonais et Soviétiques continuèrent de soigner les infections avec des phages. Le paquetage militaire distribué aux soldats de la Wehrmacht contenait même des flacons de suspensions de phages à appliquer sur les blessures de guerre. Les médecins allemands utilisèrent en particulier un traitement contre la dysenterie, nommé « Typhus-Paratyphus B-Polyfagin » (figure 8). Lorsqu'une partie de la France fut occupée, les troupes d'occupation réquisitionnèrent le « Laboratoire du Bactériophage » pour produire des préparations phagiques (ils n'exploitèrent cependant que les installations, et non pas les produits phagiques déjà créés par le laboratoire) pour ravitailler leurs troupes. D'Hérelle dut



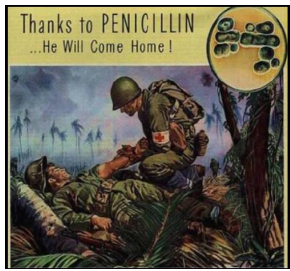
	Schachtel mit 3 Amp. zu 1 ccm	1,40
	Flasche zu 10 cm	—,70
17	Typhus-Paratyphus B-Polyfagin (Bakteriophagen Behringwerke)	
	Zus. Polyvalente Vaccine mit 500 Mill. Typhus- u. je 250 Mill. Paratyphus A- u. B-Bazillen pro ccm, 0,5% Phenol.	
	Ind. Prophylaxe des Typhus und Paratyphus.	
	Dos. 2—3 × 0,5 bzw. 1 ccm subkutan in Abständen von 7—8 Tagen.	
	Packung A (orale Anwendung):	
	Schachtel mit 6 Amp. zu 10 ccm	4,65



Hankin observed *V. cholerae* antibacterial activity in Indian river water (1896)



Bacteriophages characterized and named by d' Hérelle (1917)



Use of phages as molecular biology tools begins (1950s) and continues to present day



Phage genome sequencing begins (1980s) and continues to present day

1890 1900 1920 1940 1960 1980 2000 2010



Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)

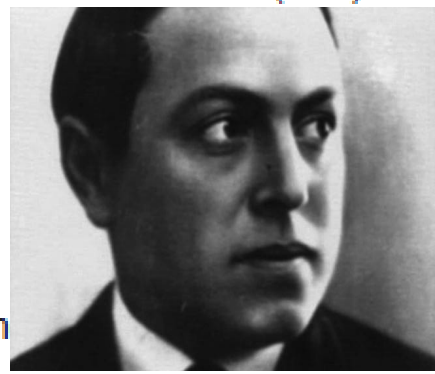


Antibacterial activity against *S. aureus* published by Twort (1915)



Anciennes fioles contenant des phages à visée thérapeutique. [B]

Phage institute set up in Tbilisi, Georgia (1923)



Phage lambda (λ) isolated (1951)

Animal studies of Smith and Huggins revitalize phage therapy research in West (1980s)

Fischetti's group demonstrate in vivo activity of phage lysins (2001)

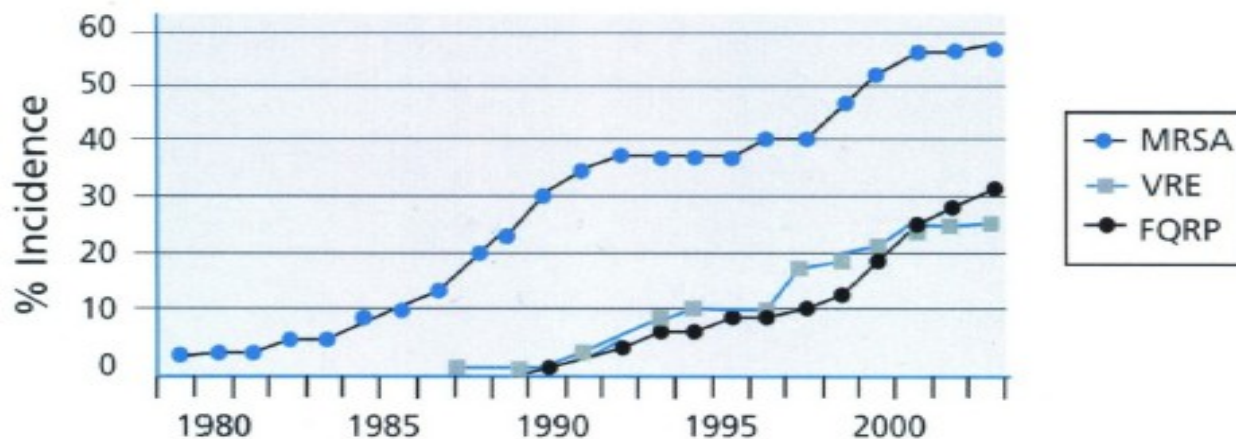
Phage cocktail for biocontrol of *Listeria* in ready-to-eat meats approved by FDA (2006)



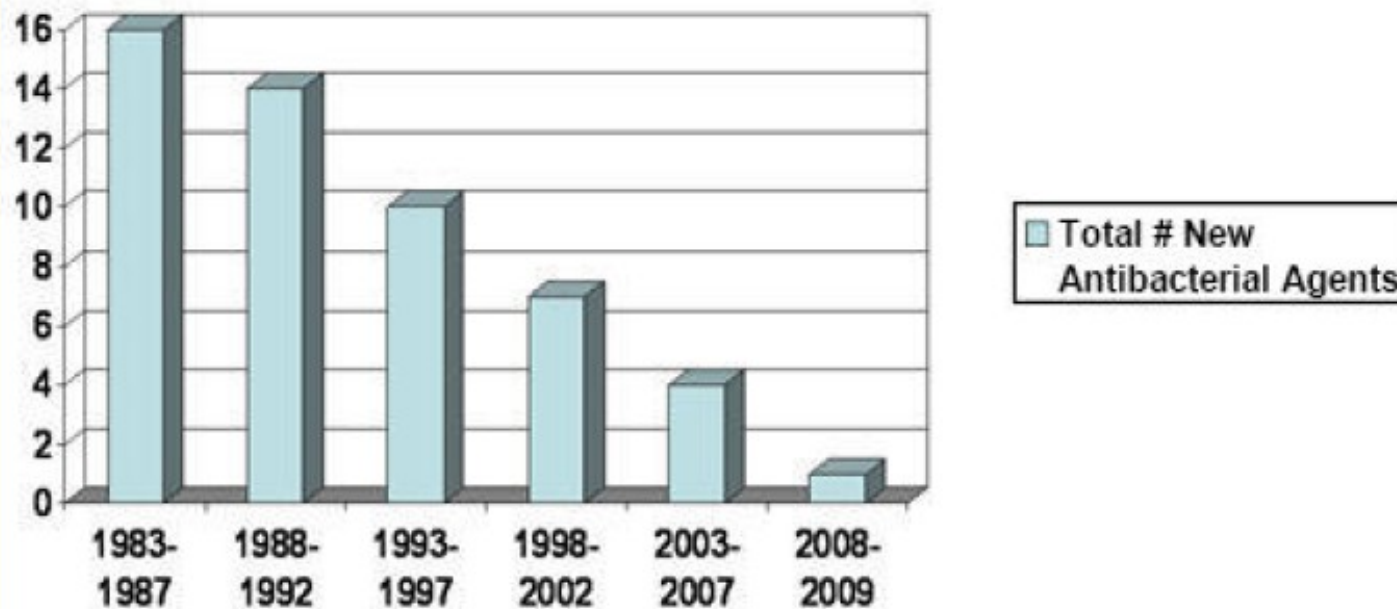
Major timelines in the history of phage therapy.

Why Is IDSA Concerned?

Resistant Bacterial Strains Spread Rapidly



DECLINING ANTIBACTERIAL APPROVALS (PAST 25 YEARS)



Spellberg, CID 2004, Modified

« 2012 and beyond : potential for the Start of a second pre-antibiotic era ? »

Peter C Appelbaum

J Antimicrob Chemother 2012;67:2062-2068

L'ENQUETE
LUNDI 11 OCTOBRE 2010 LES ÉCHOS

ANTIBIOTIQUES : CHRONIQUE D'UN DÉSASTRE ANNONCÉ

« Bombe à retardement », « situation précatastrophique »... La résistance aux antibiotiques suscite une inquiétude grandissante dans le milieu médical. En cause, la surconsommation, les médicaments génériques. Et surtout l'abandon de la recherche...

Depuis est été, le monde a un nouvel ennemi public : NDM-1. Derrière cette étrange appellation se cache le New Delhi metallo- β -lactamase, le gène d'une bactérie aux propriétés redoutables : il la rend résistante aux antibiotiques. Découvert en 2008 dans les hôpitaux britanniques, le microbe a notamment été retrouvé aux États-Unis, en Australie et... en France. Tous ces cas ont en commun de résister aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (pénicillines et céphalosporines) ainsi qu'aux très puissants carbapénèmes, utilisés à l'hôpital. Les perspectives ont de quoi inquiéter. « Pour l'instant, on ne connaît pas encore la rapidité d'expansion du phénomène [...]. J'imagine ce qui est certain, c'est que ça va se diffuser », a précisé le médecin Pierre Nordmann, chef du service microbiologie bactériologie-virologie à l'hôpital Bicêtre près de Paris, à l'occasion d'un colloque à Boston sur les maladies infectieuses. Pour ce spécialiste, la situation a même tout d'une « bombe à retardement ».

« Quelque 25.000 décès par an en Europe sont associés aux bactéries multirésistantes, dont 4.200 en France. C'est plus que les morts liées au sida. »





2014

What is Antimicrobial Resistance (AMR)?

Medicines for treating infections lose effect because the microbes change;

1. mutate
2. acquire genetic information from other microbes to develop resistance

Types of AMR

1. **Antibacterial resistance** (e.g. to antibiotics and other antibacterial drugs)
2. **Antiviral resistance** (e.g. to anti-HIV medicines)
3. **Antiparasitic resistance** (e.g. to anti-malaria medicines)
4. **Antifungal resistance** (e.g. to medicines used to treat *Candidiasis*)



AMR is a natural phenomenon accelerated by use of antimicrobial medicines. Resistant strains survive and aggregate.

Estimates of Burden of Antibacterial Resistance

European Union population 500m

25,000 deaths per year

2.5m extra hospital days

Overall societal costs
(€ 900 million, hosp. days)
Approx. €1.5 billion per year



Source: ECDC 2007

Thailand population 70m

>38,000 deaths

>3.2m hospital days

Overall societal costs
US\$ 84.6–202.8 mill. direct
>US\$1.3 billion indirect



Source: Pumarit et al 2012

United States population 300m

>23,000 deaths

>2.0m illnesses

Overall societal costs
Up to \$20 billion direct
Up to \$35 billion indirect



Source: US CDC 2013

Global information is insufficient to show complete disease burden impact and costs



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.



Rapporteurs : Dr Jean CARLET et Pierre LE COZ



Intervention de Marisol Touraine

Ministre des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes

Remise du rapport du Dr Jean CARLET sur la préservation des antibiotiques

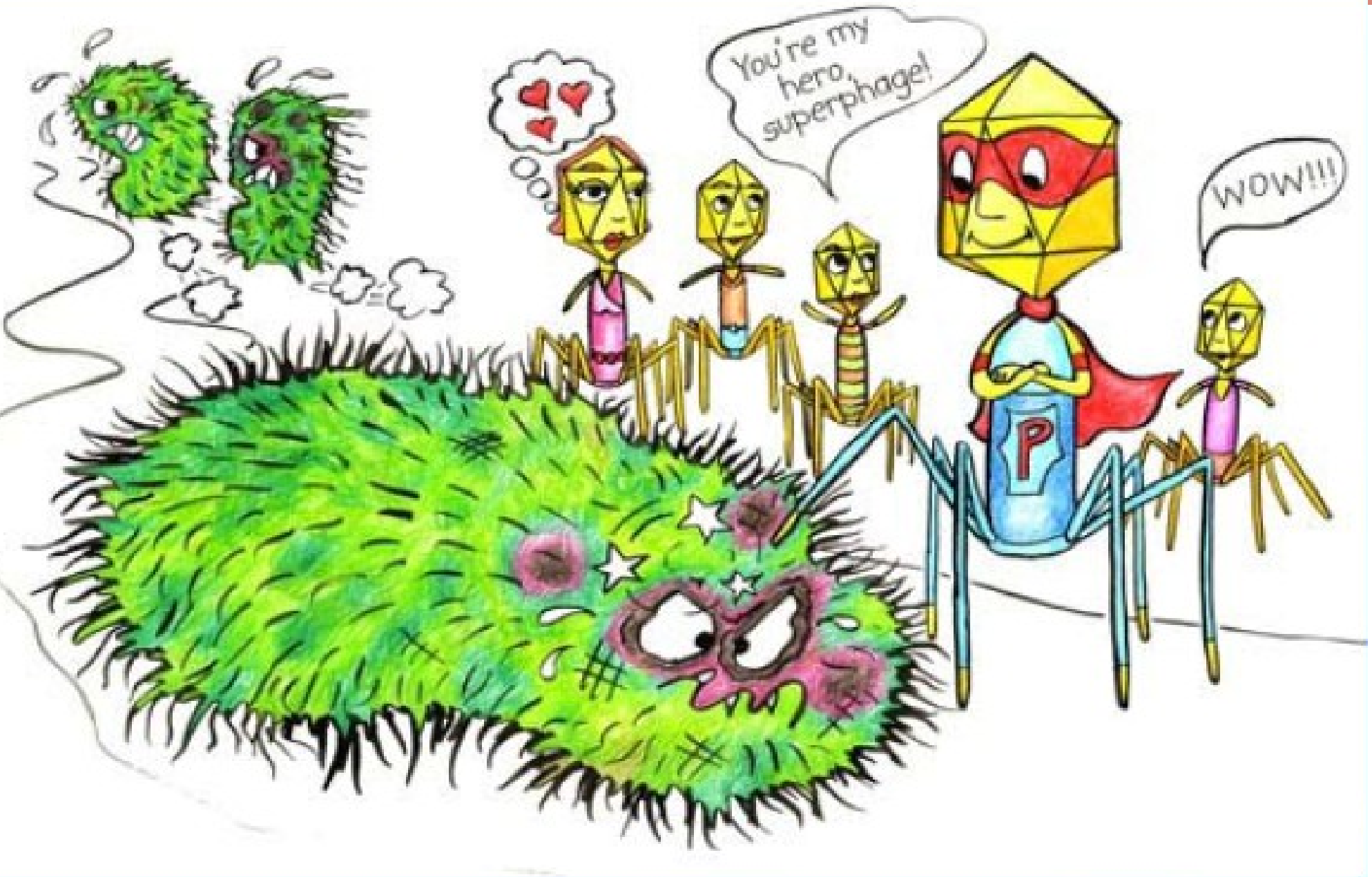
Mercredi 23 septembre 2015



MINISTÈRE
DES AFFAIRES SOCIALES,
DE LA SANTÉ
ET DES DROITS DES FEMMES

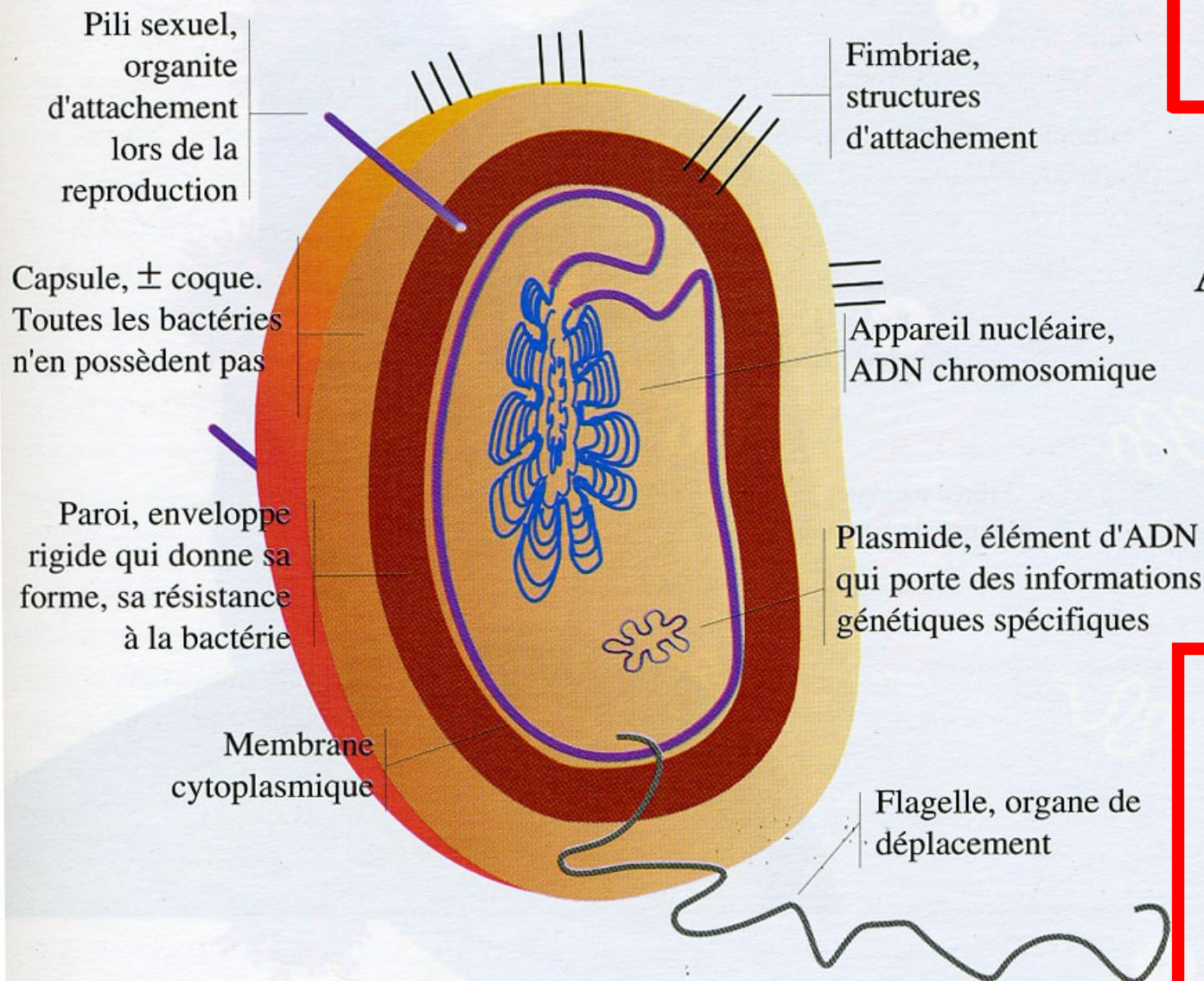
Et puis, c'est aussi à l'échelle internationale que nous devons soutenir l'innovation. Le développement de nouveaux antimicrobiens est au point mort. C'est une réalité malheureuse. Les antibiotiques ne sont pas des médicaments comme les autres, puisque par principe leur consommation doit être réduite au maximum possible ! Leur appliquer la même régulation que les autres médicaments n'a que peu de sens. **C'est pourquoi la France doit être en première ligne pour reconnaître un statut particulier aux produits de santé innovants contre l'antibiorésistance et ainsi encourager les entreprises à s'engager pour innover.**

C'est pourquoi je soutiendrai le dossier de candidature porté par les associations de patients le LIEN et AC2BMR, ainsi que par la société française de pathologies infectieuses, auprès du Premier ministre, pour **faire de la lutte contre l'antibiorésistance la grande cause nationale pour 2016.**



BACTÉRIE

(Taille moyenne : 1 000 nanomètres)



BACTÉRIOPHAGE

(50 nm)



AMAS PROTÉIQUE

(0,1 nm)

10^{32} bactériophages
(<10% connus)
(< 6 000 ϕ identifiés)

10^{31} bactéries (20% détruites/24H)

ASPECTS QUANTITATIFS

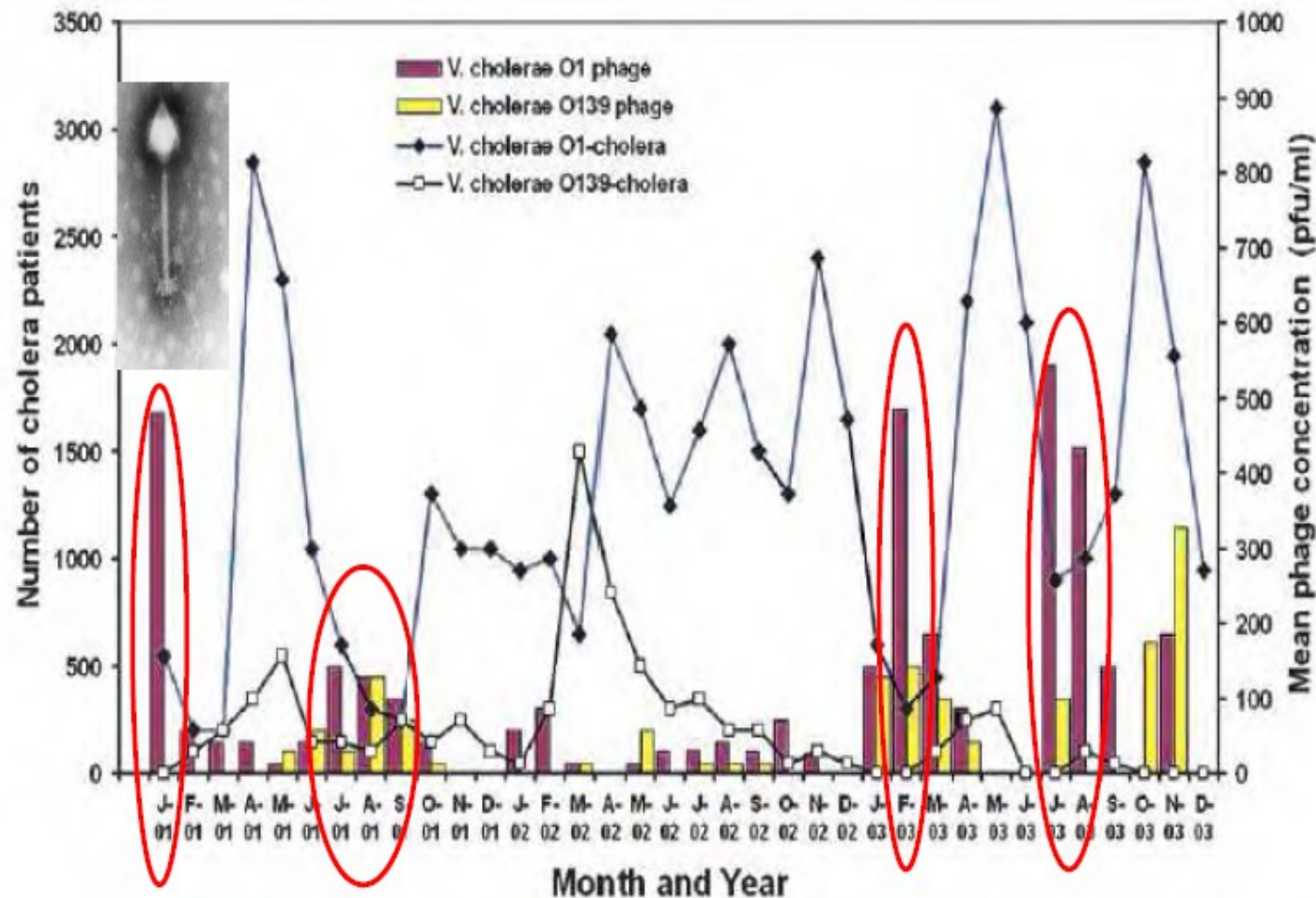
Bacteriophages live in soil (about 10^8 phages per 1 g soil); in rivers, lakes, and oceans (10^6 phages per 1 ml of sea water); and in other living beings (the human gastrointestinal tract contains about 10^{12} phages). As for the total bacteriophage population, it reaches according to scientific estimates an astronomic value of 10^{31} phages, or 10^9 tons of substance. This peculiar “dark matter” of biological origin spans the overall earth biosphere.

Some more statistics: assuming that an average diameter of a phage particle is 50 nm, all bacteriophages of the globe put in line will cover a distance of 5×10^{20} kilometers or 5×10^7 light years! This is the distance to Virgo Supercluster, nearest to us, while only 4.2 light years separate us from the nearest star, the Proxima Centauri

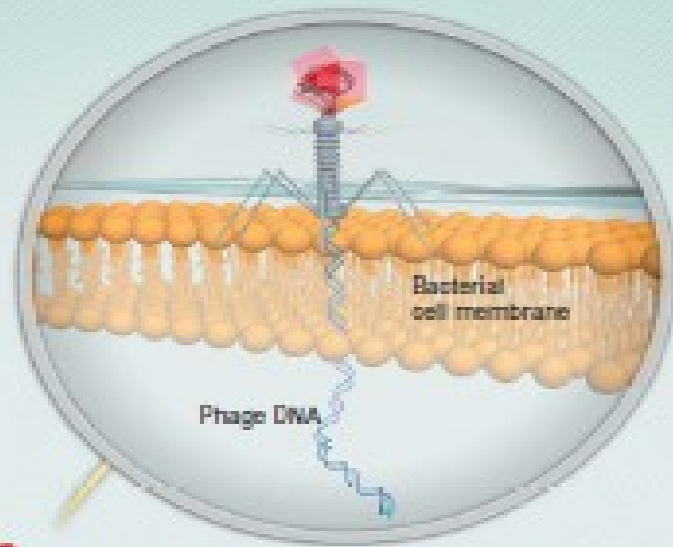
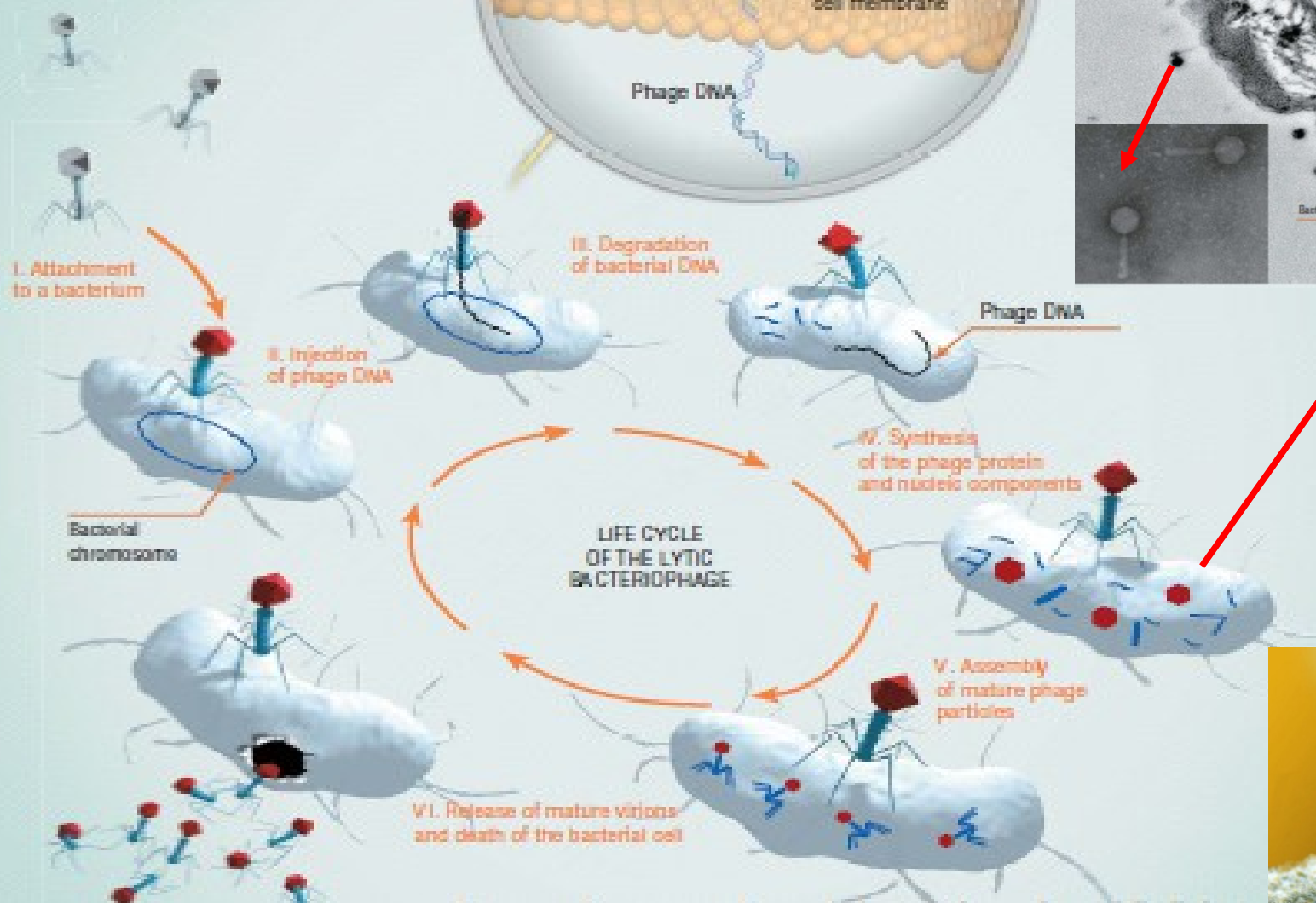


Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages

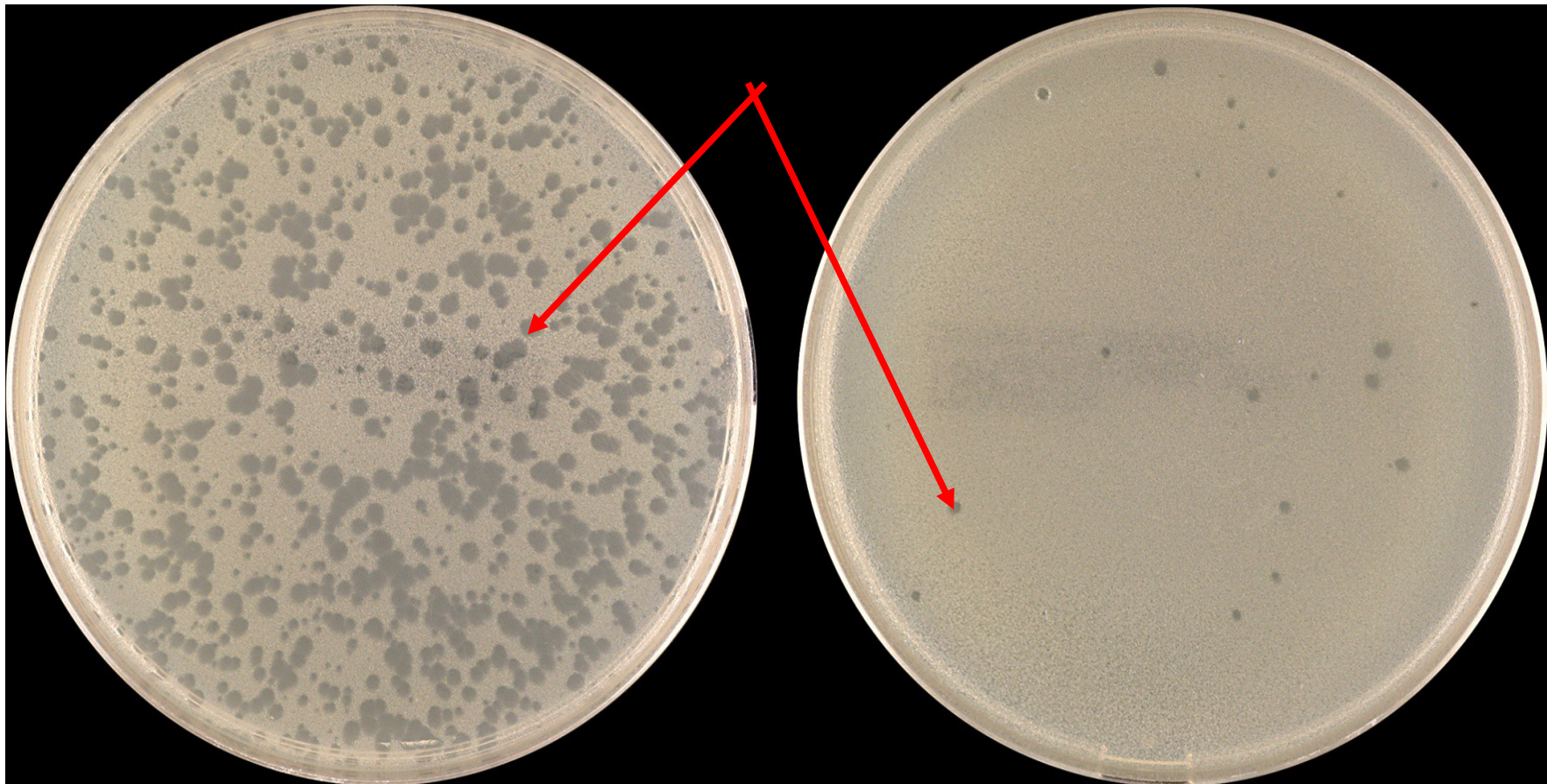
Shah M. Faruque*, Iftekhar Bin Naser*, M. Johirul Islam*, A. S. G. Faruque*, A. N. Ghosh†, G. Balakrish Nair*, David A. Sack*, and John J. Mekalanos^{‡§}



Unlike the temperate bacteriophages, lytic phages kill the bacterial cell immediately on its infection.



PHAGE COUNT

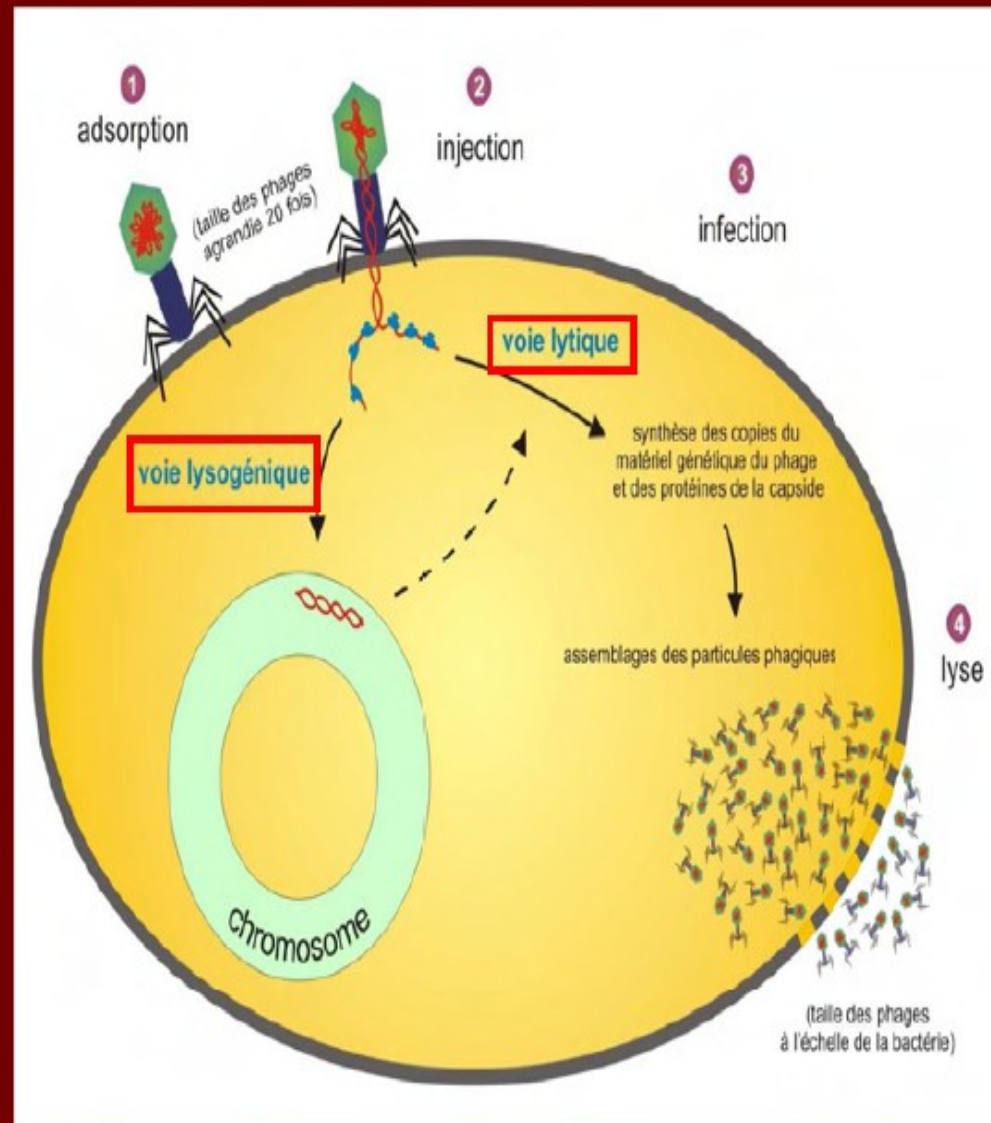


■ Phages lysogéniques

- Véhicules de matériel génétique
- Transfert du gène de la toxine
- Vibriophage filamenteux lysogénique CTX Φ

■ Phages lytiques

- Multiplication intracellulaire
- Destruction de la bactérie
- Plus de 200 bactériophages





PROPAGATION

suspension *P. aeruginosa* 1 mL

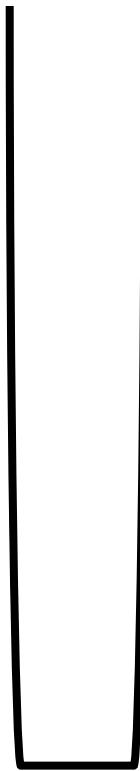
25 mL de B.P.P.



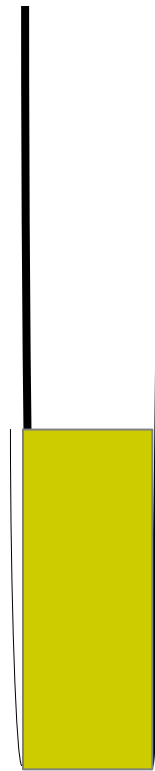
eau « sale » 25 mL
(centrifugée et filtrée)

IMPROVED

100 μ L *P. aeruginosa*

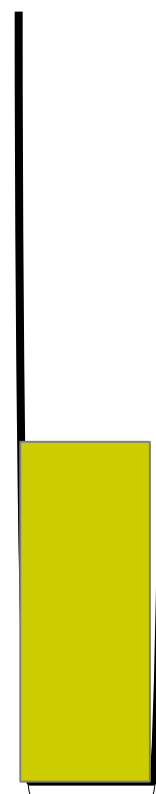


3h à 30°C

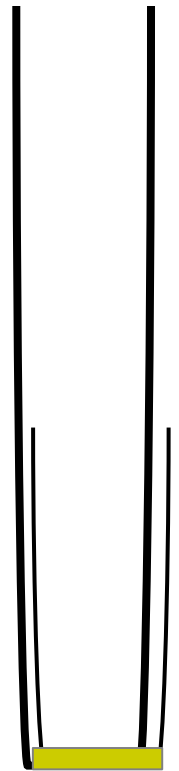


culture de *P. aeruginosa*

50 μ L bactériophage



3-5h à 30°C



éclaircissement = enrichissement



Comparison of bacteriophages vs. antibiotics

- **Live bacterial viruses**
- **Viable**
- **Specific action**
- **Self reproducible**
- **No evidence**
- **Effective against drug-resistant bacteria**
- **N/A**
- **Non-hazardous industry**
- **Inexpensive**
- **Chemical substances**
- **Standard**
- **General action**
- **N/A**
- **Side effects (e.g. allergy)**
- **Spread of drug-resistance**
- **Yeast, fungal infections**
- **Hazardous industry**
- **Expensive**

Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy

Elizabeth M. Ryan, Sean P. Gorman, Ryan F. Donnelly and
Brendan F. Gilmore

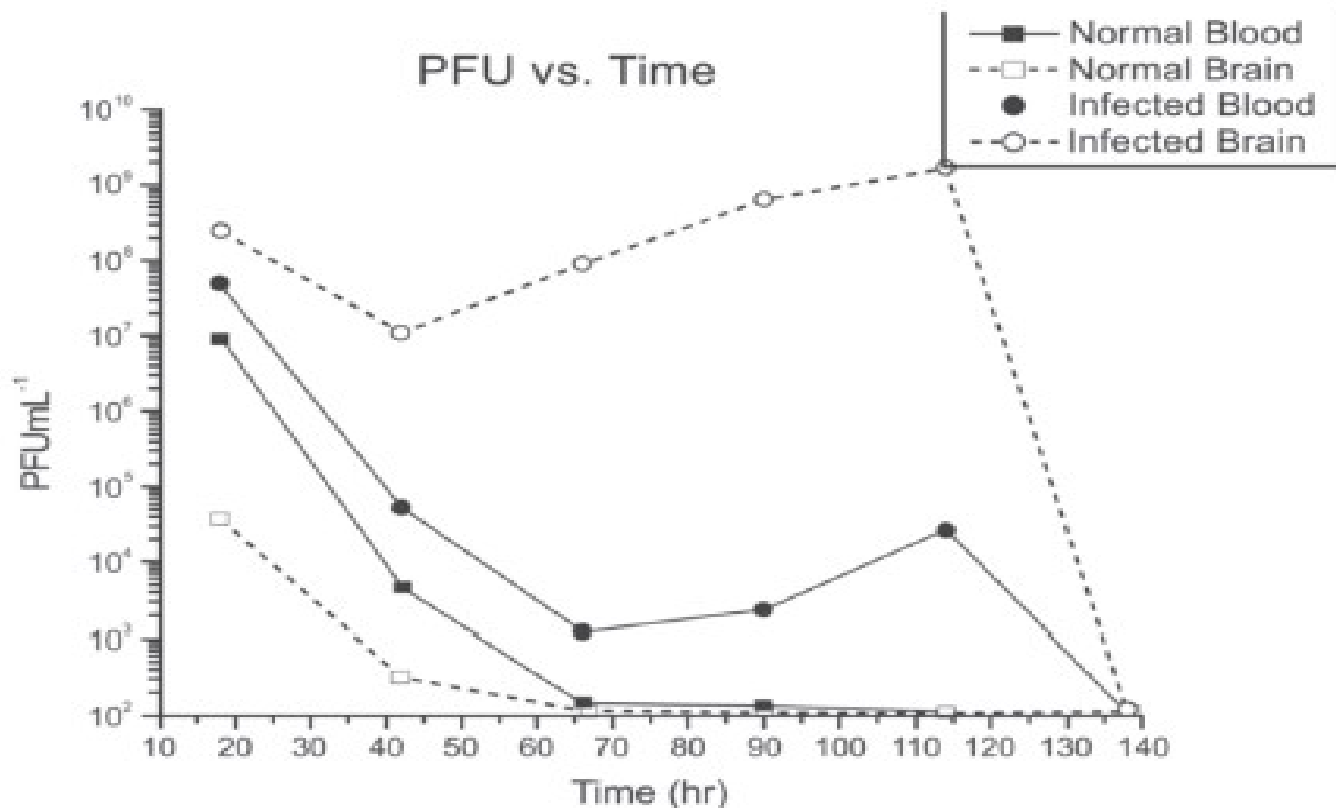
School of Pharmacy, Queens University Belfast, Belfast, UK

 **JPP** *Journal of*
Pharmacy and Pharmacology

JPP 2011, ••: ••–••

1. Parenteral delivery: intraveinuous, intramuscular, intraperitoneal
2. Intrathecal
3. Respiratory : inhalation
4. Oral delivery
5. Intrarectal
6. Cutaneous
7. Intravésical

Figure 1. This figure, based on the data in the 1943 mouse studies of Rene Dubos,⁷⁸ provides significant insight into why phage therapy works well even in treating infections that antibiotics can't reach. When he injected the mice intraperitoneally with 10^9 phages, they quickly appeared in the blood stream, entering the brain, but they were rapidly cleared. However, if the mice were also injected intracerebrally with *Shigella dysenteriae*, the host for these phages, then 46/64 of the mice survived (as compared with 3/84 in the absence of appropriate viable phage) and the brain level of phage climbed to over 10^9 per gram. Once the bacteria were cleared, phage levels dropped below detection limits.



2 SITUATIONS, 2 UTILISATIONS

Sensibilité aux antibiotiques

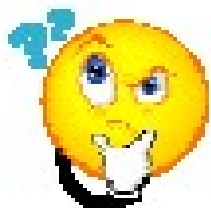
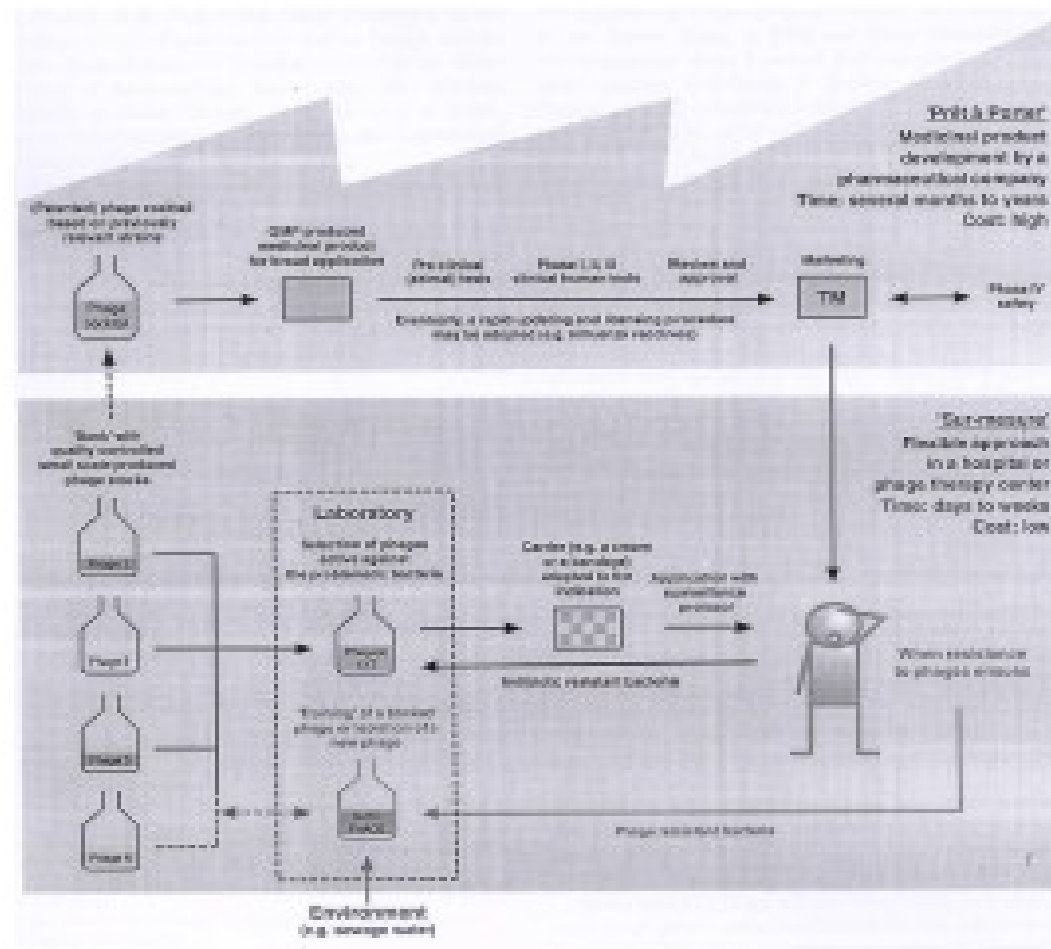
Pour des bactéries multiresistantes (alternative)
Pour des bactéries sensibles (synergie)

Mode d'utilisation

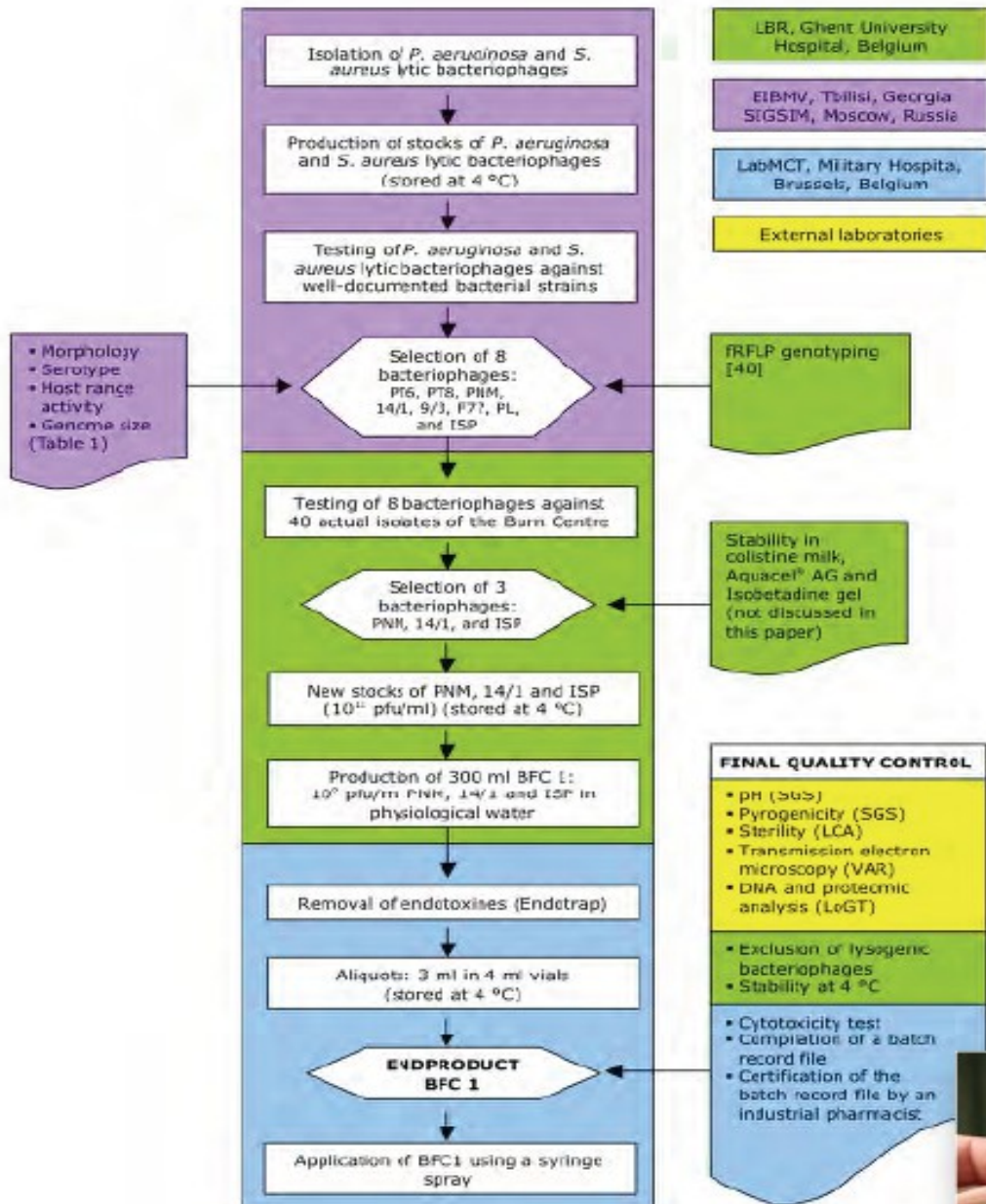
Empirique : cocktail
Adapté à la bactériologie

The phage paradigm: *Prêt-a-porter* or *Sur mesure*?

J.P.Pirney et al., Pharm. Res., 2011, 28:934-937



Maya Merabishvili^{1,2,8}, Jean-Paul Pirnay^{2*}, Gilbert Verbeke², Nina Chanishvili¹, Marina Tediashvili¹, Nino Lashkhi¹, Thea Glonti¹, Victor Krylov³, Jan Mast⁴, Luc Van Parys⁵, Rob Lavigne⁶, Guido Volckaert⁶, Wesley Mattheus⁶, Gunther Verween², Peter De Corte², Thomas Rose², Serge Jennes², Martin Zizi^{5,7}, Daniel De Vos², Mario Vanechoutte⁸



Un cocktail de phages (BFC-1) avec contrôle de qualité

- Un manque de produits bien définis et caractérisés
- Souvent l'interaction récepteur-phage entre la bactérie et les phages n'était pas optimale (empirisme)
- Présence d'endotoxines.
- Une production "GMP-like"

OPEN ACCESS Freely available online 

Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials

Maya Merabishvili^{1,2,8}, Jean-Paul Pirnay^{2*}, Gilbert Verbeke², Nina Chanishvili¹, Marina Tediashvili¹, Nino Lashkhi¹, Thea Glonti¹, Victor Krylov³, Jan Mast⁴, Luc Van Parys⁵, Rob Lavigne⁶, Guido Volckaert⁶, Wesley Mattheus⁶, Gunther Verween², Peter De Corte², Thomas Rose², Serge Jennes², Martin Zizi^{5,7}, Daniel De Vos², Mario Vanechoutte⁸

1 Tbilisi Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology (IBMV), Tbilisi, Georgia, 2 Laboratory for Molecular and Cellular Technology (LabMCT), Burn Centre, Queen Mary's Military Hospital, Brussels, Nadia-over-Haarlembeek, Brussels, Belgium, 3 Laboratory of Bacteriophage Genetics, State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (SIGSIM), Moscow, Russia, 4 Unit Electron Microscopy, Veterinary and Agricultural Research Centre (VAR), Uddel, Brussels, Belgium, 5 Section Health of the Division Well-being, Belgian Defense Staff, Queen Astrid Military Hospital, Nadia-over-Haarlembeek, Brussels, Belgium, 6 Laboratory of Gene Technology (LGT), Vrije Universiteit Brussel, Jette Brussels, Belgium, 7 Laboratory of Bacteriology



Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products

Jean-Paul Pirnay • Bob G. Blasdel • Laurent Bretaudeau • Angus Buckling • Nina Chanishvili • Jason R. Clark • Sofia Corte-Real • Laurent Debarbieux • Alain Dublanquet • Daniel De Vos • Jérôme Gabard • Miguel Garcia • Marina Goderdzishvili • Andrzej Górski • John Hardcastle • Isabelle Huys • Elizabeth Kutter • Rob Lavigne • Maia Merabishvili • Ewa Olchawa • Kaarle J. Parikka • Olivier Patey • Flavie Pouilot • Gregory Resch • Christine Rohde • Jacques Scheres • Mikael Skurnik • Mario Vaneechoutte • Luc Van Parys • Gilbert Verbeken • Martin Zizi • Guy Van den Eede

Table 1 Expert Consensus Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products

A. Production environment

When production activities include the processing of intermediate, bulk or finished phage products exposed to the environment, this must take place in an environment with specified air quality and cleanliness in order to minimize the risk of contamination. The effectiveness of these measures must be validated and monitored. Where intermediate, bulk or finished products are exposed to the environment during processing, without a subsequent microbial inactivation process, an *air quality* with particle counts and microbial colony counts equivalent to those of Grade A as defined in the current European Guide to Good Manufacturing Practice (GMP), Annex 1 and Directive 2003/94/EC is required with a background environment at least equivalent to GMP Grade D in terms of particles and microbial counts. The biosafety level (BSL) is determined by the host bacteria used in the production processes (e.g., BSL-2 for *Pseudomonas aeruginosa*).

C. Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) specifications

Products/characteristics	Control test	Limits of acceptance	Recommended test procedures
--------------------------	--------------	----------------------	-----------------------------

C.1. Host bacteria used in production (stock suspensions)

The bacterial hosts used in the production process – with the exception of selection, adaptation and efficiency of plating (EOP) and host range determination – should be as safe (or least pathogenic) as feasible.

Origin	Document pedigree/ history/pathogenicity level	Known origin	Screening of scientific literature, lab books, consignment letters,...
Identification	Identification at the species and strain levels	Matching species and strain identification	<ul style="list-style-type: none"> • State of the art clinical microbiology techniques • Highly discriminating (molecular/genomic) typing techniques (e.g., MLST, AFLP, PFGE, Rep-PCR, ...)
Most often it will not be possible to find or quickly generate a suitable host bacterium that is free of prophages or phage-like elements, but one should nevertheless strive to use non-lysogenic strains, containing as few phages or other phage-like elements of genetic exchange [11, 12] as possible	<ul style="list-style-type: none"> • Induction of phages • Host genome screening for phage or phage-like elements 	As few spontaneously produced (or by induction) temperate phages, complete prophage sequences or phage-like elements as possible ²	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In vitro</i> induction methods (Mitomycine C [13] or UV induction) • State of the art DNA sequencing and analysis (bioinformatics) procedures
Avoid mutator strains as host bacteria	Screen for mutator strains in case of doubt	No mutator strain	State of the art tests (e.g., fosfomycin and rifampicin Disk Diffusion Tests) [14]
Validated preservation/storage (cryopreservation, freeze-drying, ...)	Monitor storage conditions (e.g., temperature)	Variable, depending on the preservation method	Variable (e.g., temperature probes, temperature indicator labels, ...)
C.2. Bacteriophages (Master Seed lots)			
Origin		<ul style="list-style-type: none"> • Known origin 	

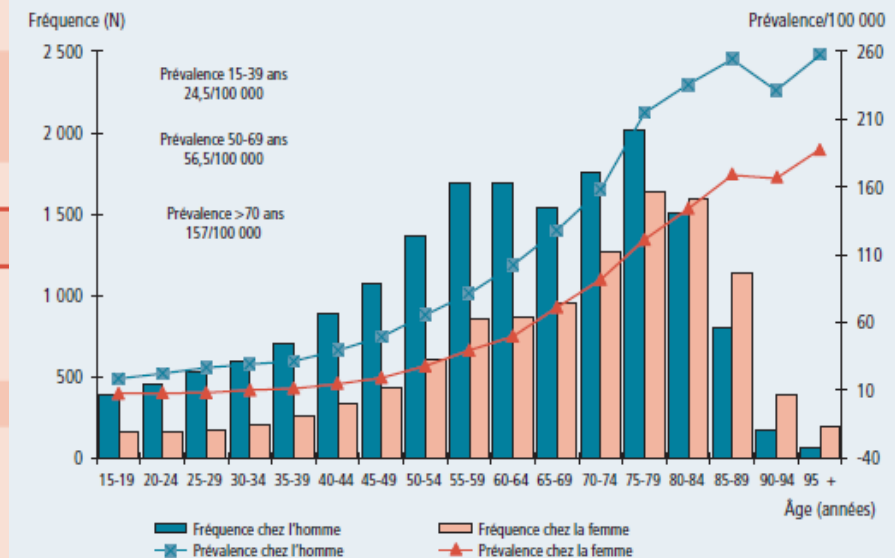
Surveillance hospitalière des infections ostéo-articulaires en France : analyse des données médico-administratives, PMSI 2008

Tableau 1 Impact clinique et économique des infections ostéo-articulaires, France, 2008 / Table 1 Clinical and economical hospital burden of bone and joint infections, France, 2008

	IOA native N (%)	IMOA N (%)	p
Caractéristiques des séjours	24 643 (68)	11 448 (32)	
Type d'IOA			
Ostéoarthrite	10 368 (42,1)	8 235 (71,9)	0,01
Ostéomyélite	10 852 (44,1)	1 654 (14,5)	
Spondylodiscite	3 423 (13,9)	174 (1,5)	
Non précisé	0 (0,0)	1 385 (12,1)	
Secteur public d'hospitalisation	20 514 (83,2)	7 919 (69,2)	NS
Passage en chirurgie	11 334 (46,0)	8 513 (74,3)	0,01
Réanimation/soins intensifs	1 552 (6,3)	689 (6,0)	NS
Mode de sortie – transfert			
Domicile	17 447 (70,8)	6 711 (58,6)	10 ⁻³
Décès	931 (3,8)	391 (3,4)	NS
Long séjour	216 (0,9)	111 (1,0)	NS
SSR	3 485 (14,1)	3 004 (26,2)	10 ⁻³
MCO	2 511 (10,1)	1 204 (10,5)	NS
Psychiatrie	53 (0,2)	27 (0,2)	NS
DMS (jours [IC95%])	16,8 [16,6-17,1]	18,9 [18,5-19,3]	0,01
Établissement public	18,2 [17,9-18,5]	20,9 [20,4-21,4]	0,01
Établissement privé ^a	10,2 [9,8-10,6]	14,5 [14,0-15,0]	0,01
Coût moyen par séjour (euros)	6 721	8 161	0,01
Caractéristiques des patients	19 100 (66,8)	9 479 (33,2)	
Sexe			
Homme	12 188 (63,8)	5 043 (53,2)	10 ⁻³
Femme	6 912 (36,2)	4 310 (45,5)	10 ⁻³
Létalité intra-hospitalière	931 (3,8)	391 (3,4)	NS
Type d'IOA			
Ostéoarthrite	8 463 (44,3)	4 944 (52,2)	10 ⁻³
Ostéomyélite	8 157 (42,7)	1 917 (20,2)	10 ⁻³
Spondylodiscite	2 480 (13,0)	212 (2,2)	10 ⁻³
Non précisé	0	2 406 (25,4)	-

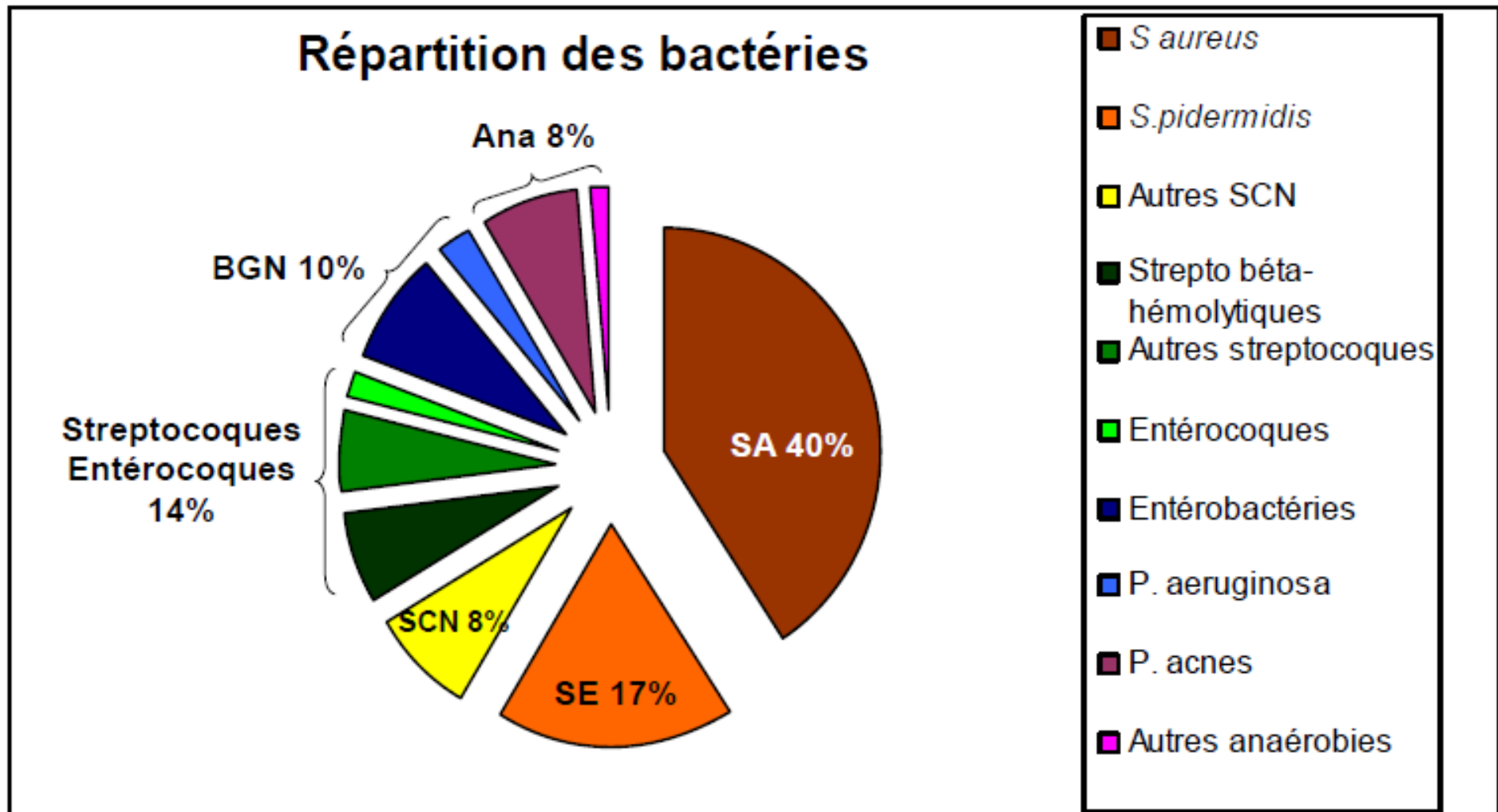


Figure 1 Fréquence et taux de prévalence des infections ostéo-articulaires standardisé sur le sexe et l'âge, France, 2008 / Figure 1 Frequency and prevalence rate standardised on sex and age of bone and joint infections, France, 2008





dans les IPOA monomicrobiennes (n=260)



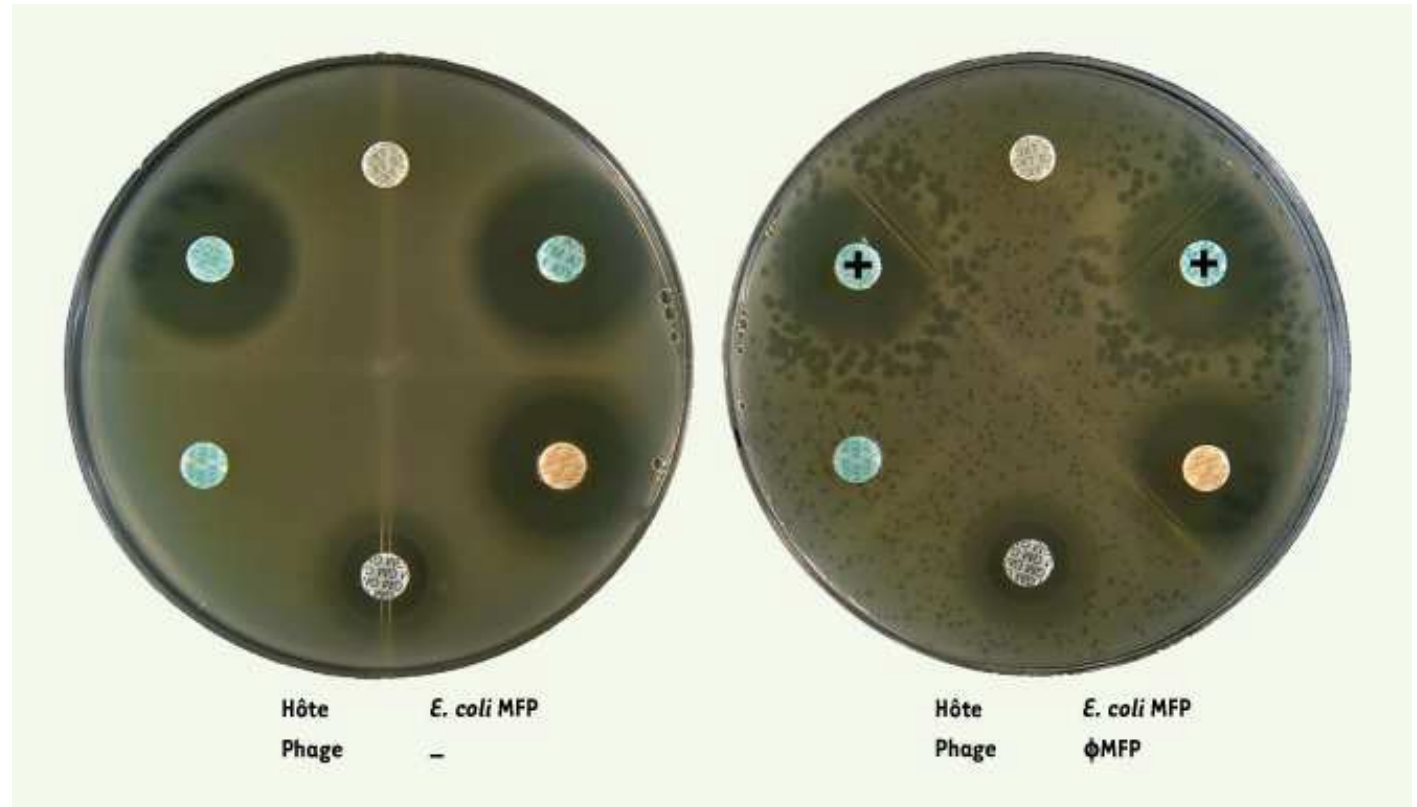
Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth

André M. Comeau¹*, Françoise Tétart¹*, Sabrina N. Trojet¹, Marie-Françoise Prère^{1,2}, H. M. Krisch^{1*}

1 Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier-Toulouse, Toulouse, France, 2 Laboratoire de Bactériologie, Institut Fédératif de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

Rôle du système SOS ?

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.



Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. La « synergie phages-antibiotiques » : un enjeu pour la phagothérapie. Médecine/Sciences 2008; 24: 449-51

Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth

André M. Comeau^{1,2}, Françoise Tétart^{1,2}, Sabrina N. Trojet¹, Marie-Françoise Prère^{1,2}, H. M. Krisch^{1*}

¹Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier-Toulouse, Toulouse, France, ²Laboratoire de Bactériologie, Institut Fédératif de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

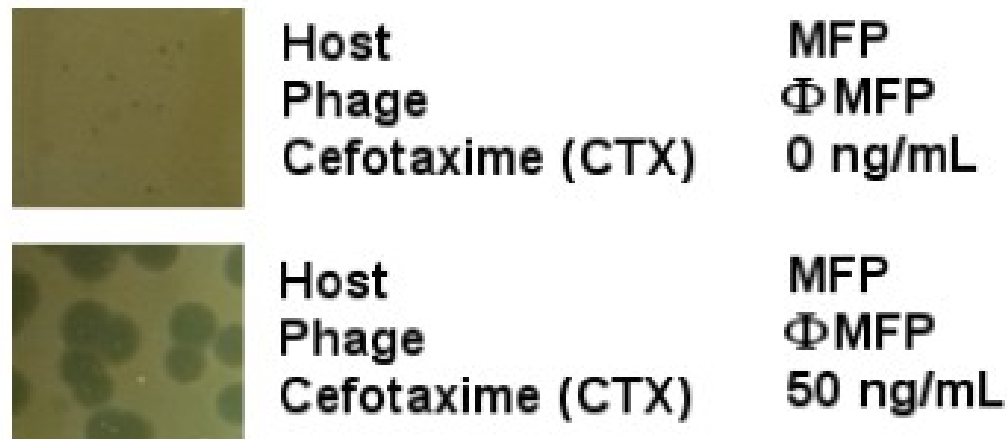


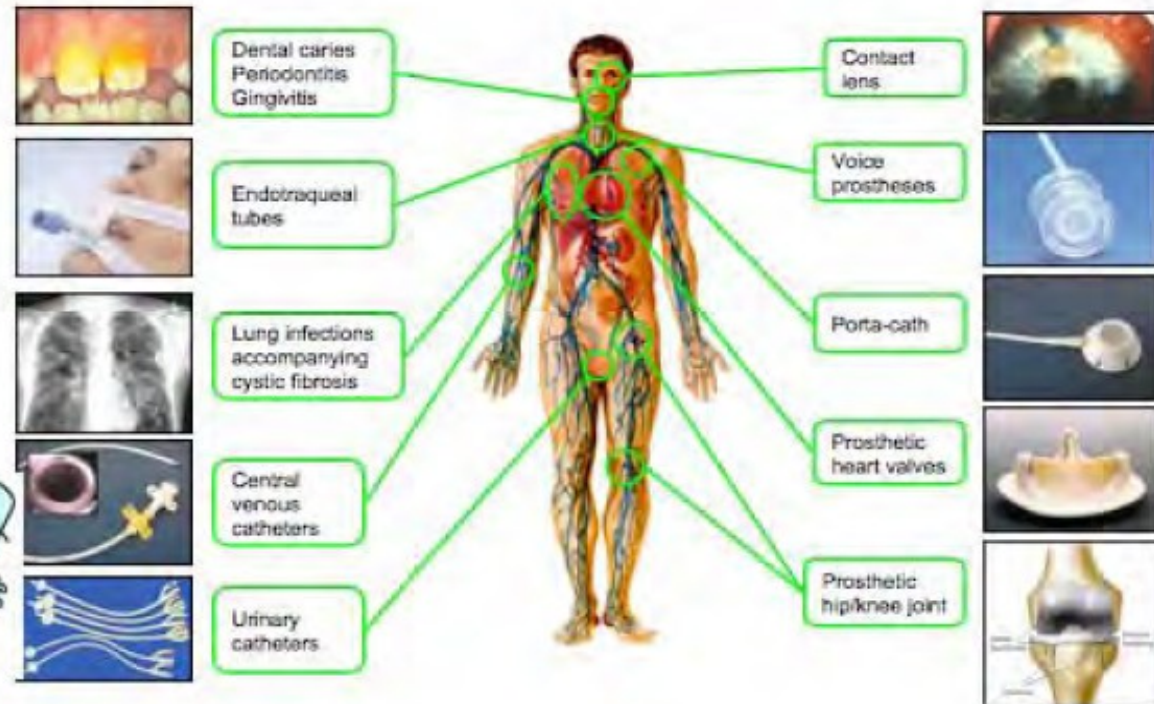
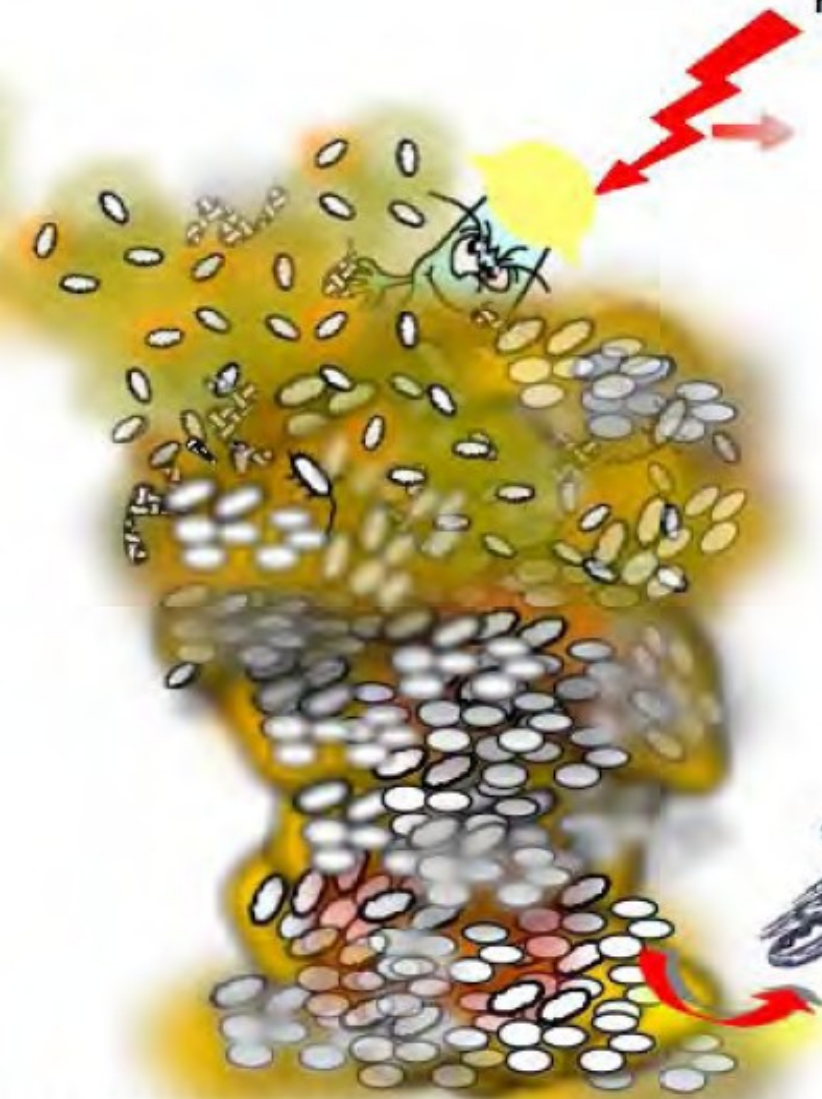
Figure 2. Plaque sizes of phage ϕ MFP on *E. coli* MFP with and without 50 ng/mL of cefotaxime (CTX) in Luria agar plates.

doi:10.1371/journal.pone.0000799.g002

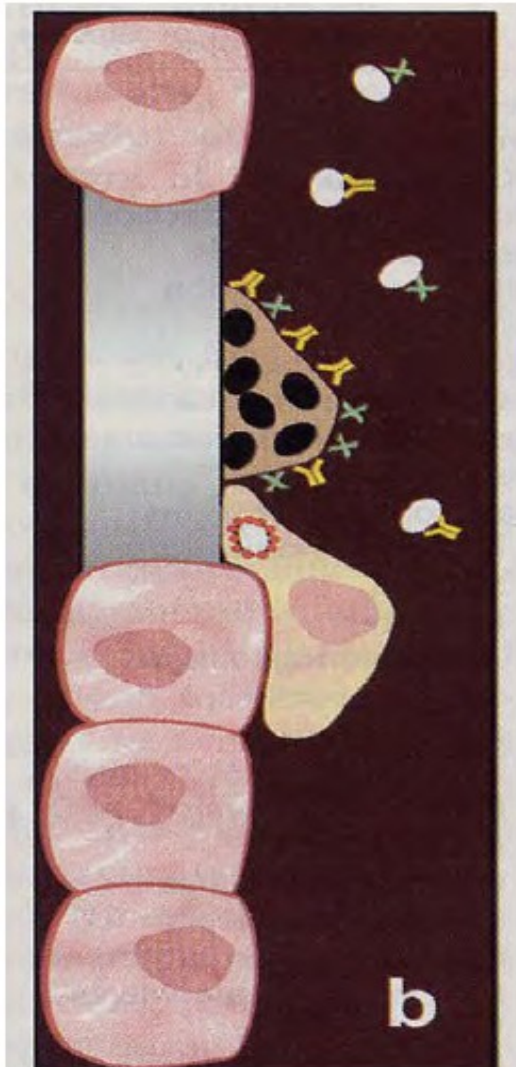
WHY BIOFILM AND NOSOCOMIAL INFECTIONS

nécessité de lutte/control du biofilm

50 to 60% associated with biofilm



BIOFILM AND FOREIGN MATERIAL



Bactéries sessiles = adhésion
sur une surface inerte et entre
elles → un biofilm

- . résistante aux anticorps
- . aux phagocytes
- . à certains antibiotiques

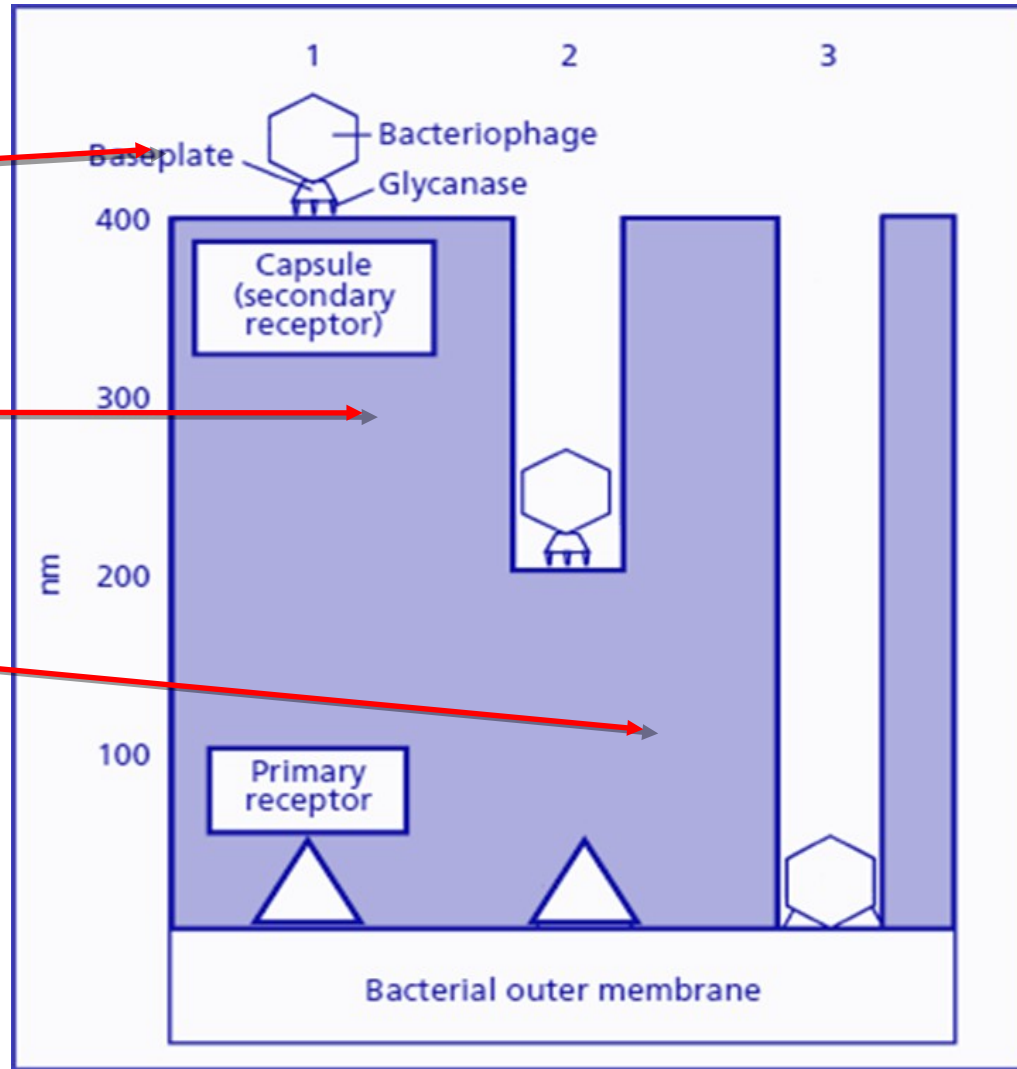
× Antibiotique Y Anticorps ■ Enzymes phagocytes
○ Bactéries planctoniques ● Bactérie Biofilm

Phages and biofilms

site secondaire

dépolymérase

site primaire



Hughes, K.A. et al., *Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase*. *Microbiology*, 1998. **144**: p. 3039-47. (adaptation de Lindberg AA 1977).

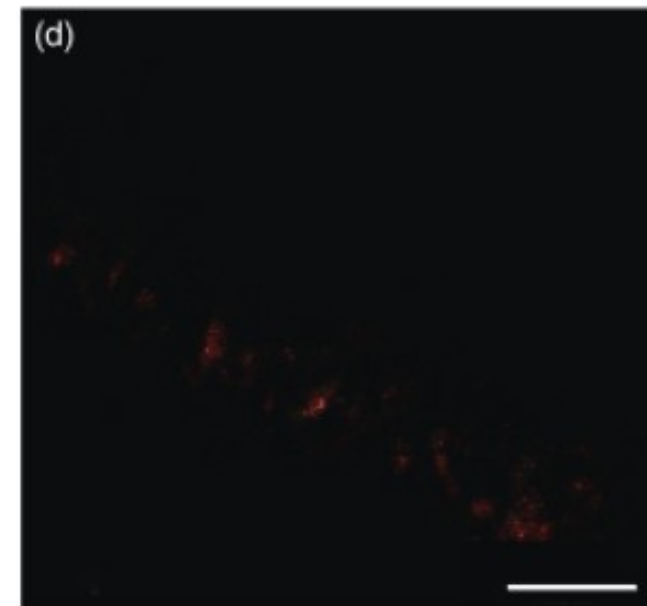
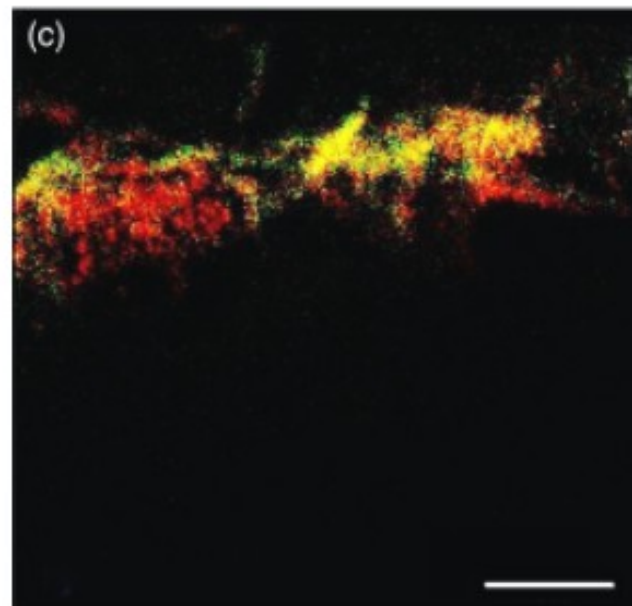
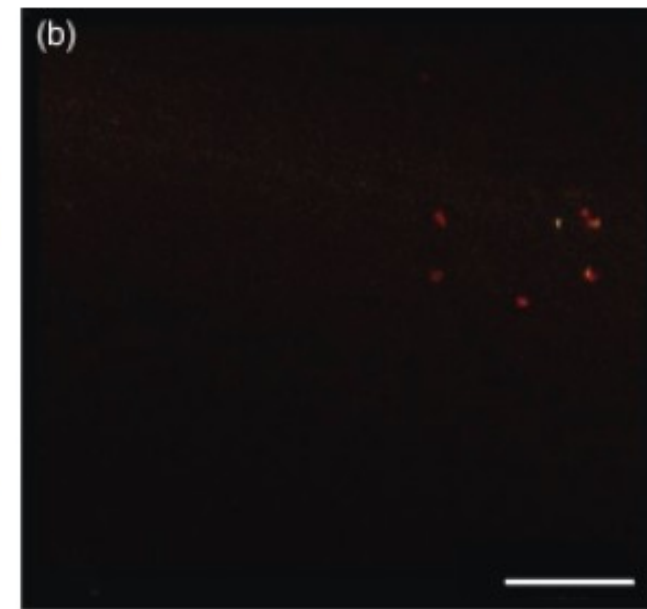
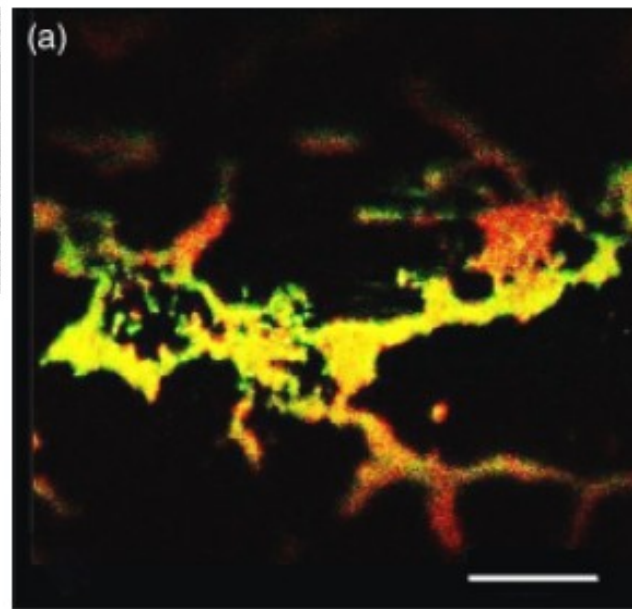
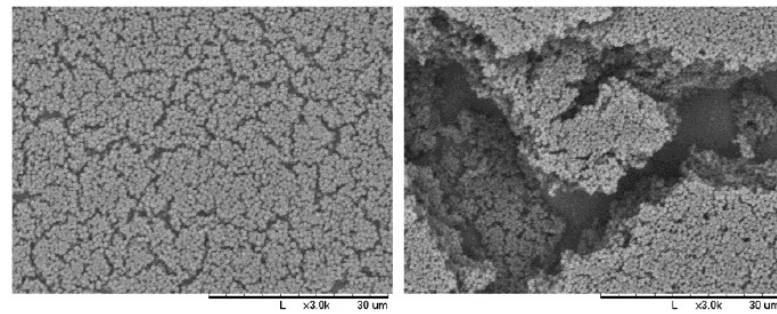


Fig. 6. Confocal scanning laser microscopy images of biofilm on the surfaces of Bard Lubri-Sil™ Foley catheters. Biofilms are stained with Live/Dead BacLight™. Left-hand images show biofilm growth of (a) *Escherichia coli* ATCC 11303 and (c) *Proteus mirabilis* 13 HER1094 on the surface of nontreated catheter segments. Right-hand images show a marked reduction in biofilm growth on the surfaces of bacteriophage-treated catheters. (b) *Escherichia coli* on a catheter treated with T4 bacteriophage and (d) *P. mirabilis* on a catheter treated with coli-proteus bacteriophage. Scale bars = 30 μm.

Bacteriophage Therapy in Implant-Related Infections

An Experimental Study

Cengiz Yilmaz, MD, Mehmet Colak, MD, Banu Coskun Yilmaz, MD, Gulden Ersoz, MD,
Mzia Kutateladze, PhD, and Mehmet Gozlugol, MD

Background: Implant-related infections with bacteria resistant to multiple antibiotics represent one of the major problems in orthopaedic surgery. It was our hypothesis that local application of bacteriophages, which are bacteria-destroying viruses, would be effective against biofilm-forming bacteria.

Methods: An implant-related infection model was created using methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in forty-eight rats and *Pseudomonas aeruginosa* in another forty-eight rats. Each group was divided into four subgroups; one subgroup received a bacterium-specific bacteriophage (Sb-1 in the MRSA group and PAT14 in the *Pseudomonas aeruginosa* group), one received antibiotic for fourteen days (20 mg/kg/day teicoplanin in the MRSA group, and 120 mg/kg/day imipenem + cilastatin and 25 mg/kg/day amikacin in the *Pseudomonas* group), one received antibiotic and bacteriophage, and one received no treatment. Animals receiving bacteriophage therapy were injected locally with 10^7 bacteriophages in a 0.1-mL suspension on three consecutive days. All animals were killed on the fifteenth day after initiation of treatment, and the tibia was excised. Results were assessed with use of microbiology, light microscopy, and electron microscopy.

CHARGE BACTERIENNE

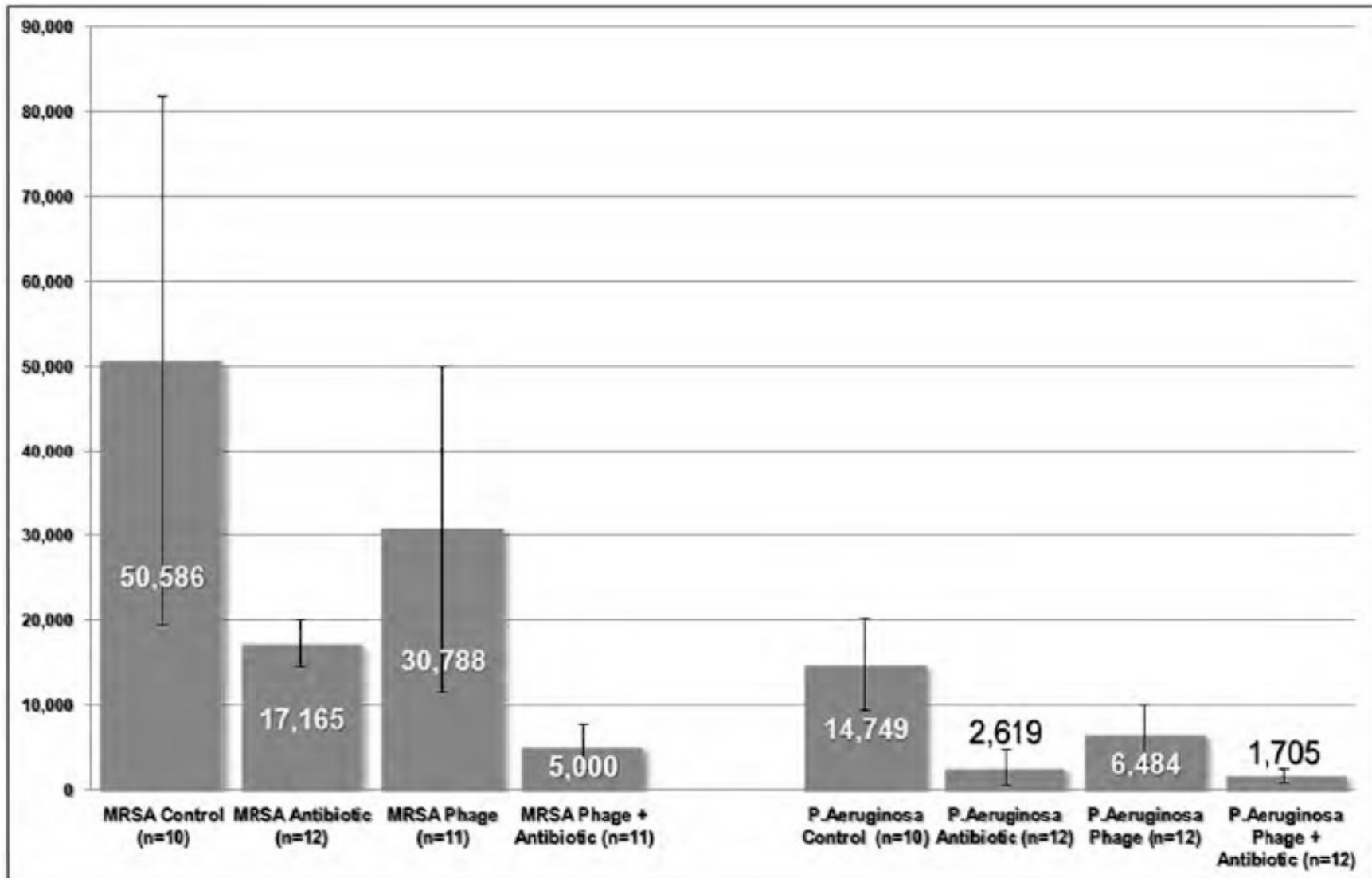


Fig. 3

Quantitative culture counts (in colony-forming units). The error bars indicate the standard error of the mean. MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

ACTION SUR LES BIOFILMS

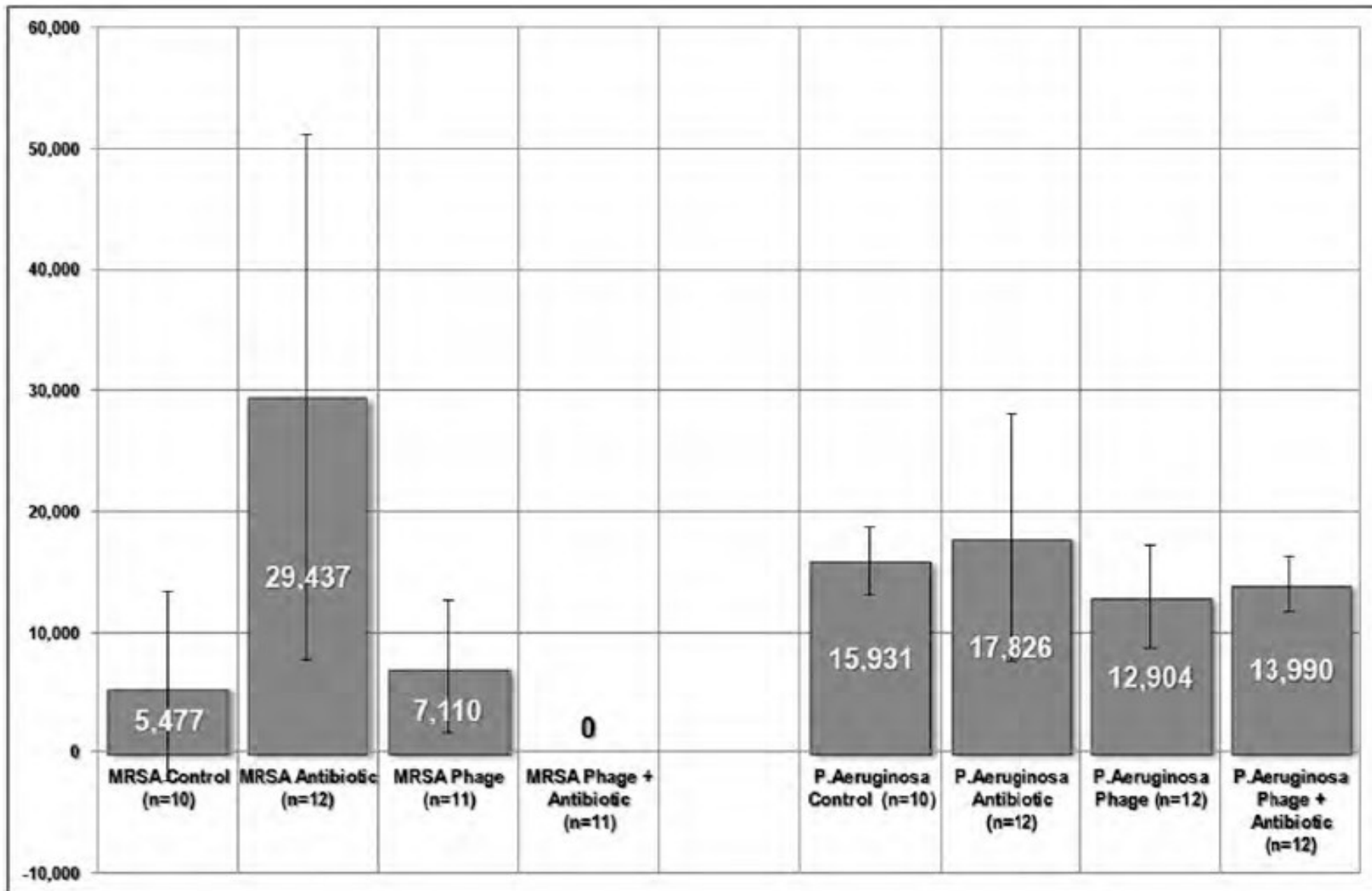


Fig. 5
Biofilm thickness (in nm). The error bars indicate the standard error of the mean. MRSA = methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections

Sanjay Chhibber*, Tarsem Kaur, Sandeep Kaur

Department of Microbiology, Panjab University, Chandigarh, India

PLOS ONE | www.plosone.org

February 2013 | Volume 8 | Issue 2 | e56022

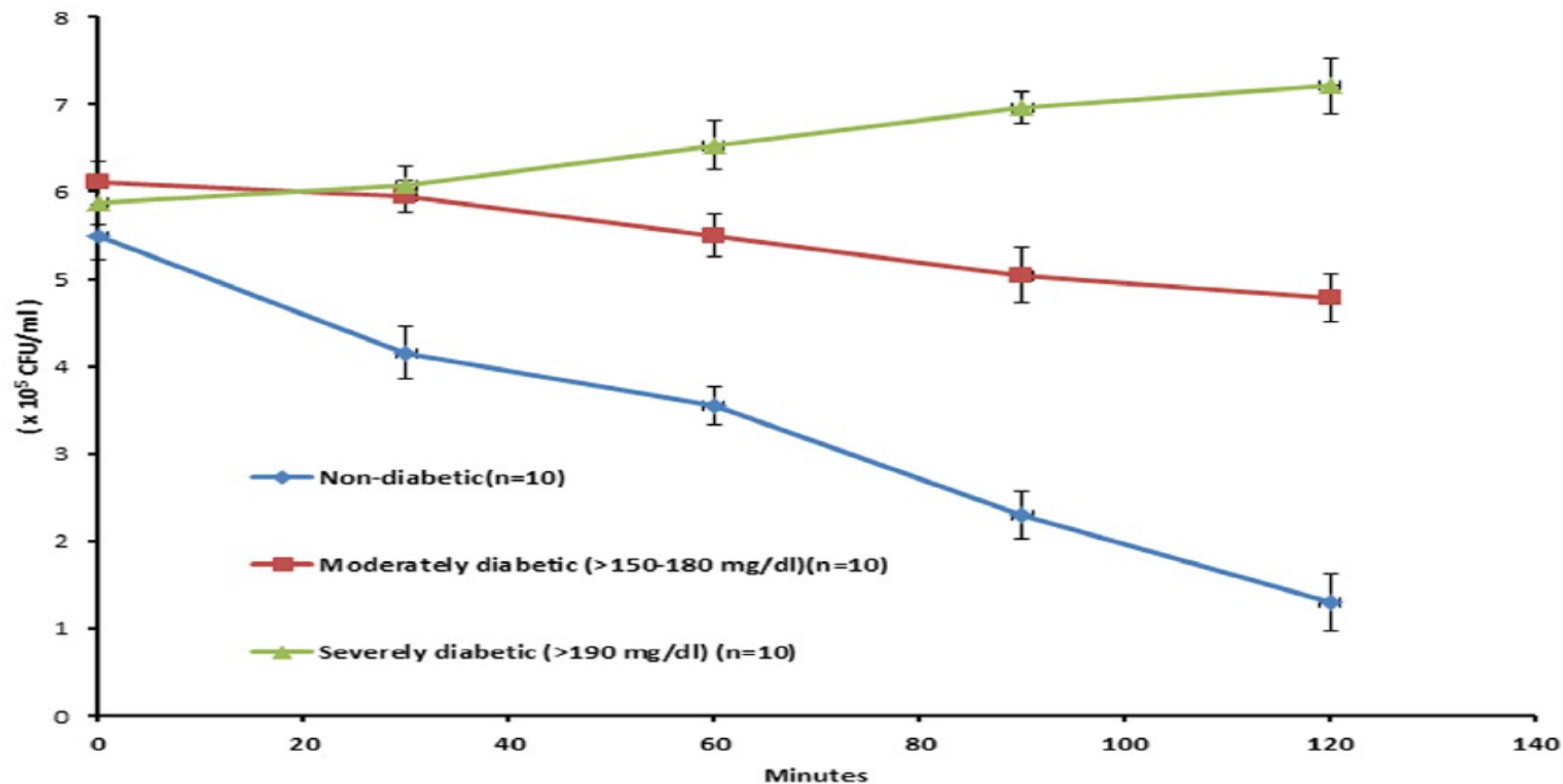


Figure 2. Bacterial load (CFU/ml) as compared to non-diabetic control after incubation of *S.aureus* ATCC 43300 in blood obtained from different groups of animals. [Data points represent mean \pm S.D of ten independent values (n = 10)].

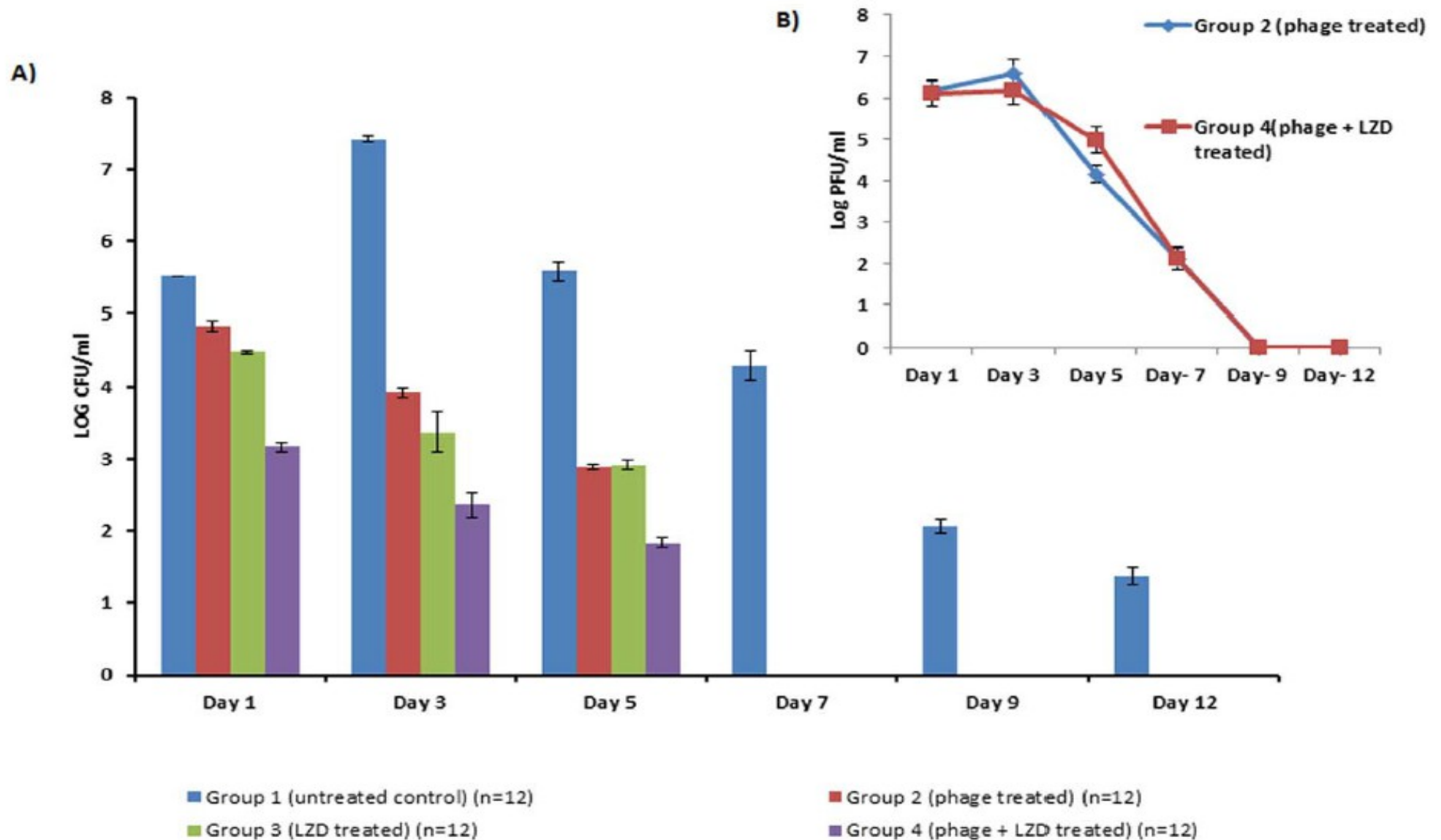


Figure 4. Bacterial load (in terms of Log CFU/ml) in A) Hindpaws of diabetic BALB/c mice following treatment with phage MR-10, linezolid and combination of phageMR-10 and linezolid (25 mg/kg/per oral) and Phage titers(in terms of Log PFU/ml) in B) Hindpaws of phage treated (group 2) and phage + LZD treated (group 4). [Error bars represent the standard deviation (S.D) from four independent values].

Staphylococcus aureus biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption

Background: Osteomyelitis is a severe and often debilitating disease characterized by inflammatory destruction of bone. Despite treatment, chronic infection often develops which is associated with increased rates of treatment failure, delayed osseous-union, and extremity amputation. Within affected bone, bacteria exist as biofilms, however the impact of biofilms on osteoblasts during disease are unknown. Herein, we evaluated the effect of *S. aureus* biofilms on osteoblast viability, osteogenic potential, and the expression of the pro-osteoclast factor, receptor activator of NF- κ B ligand (RANK-L).

Methods: Osteoblasts were exposed to biofilm conditioned media (BCM) from clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* under normal growth and osteogenic conditions to assess cellular viability and osteoblast differentiation, respectively. Cell viability was evaluated using a live/dead assay and by quantifying total cellular DNA at days 0, 1, 3, 5, and 7. Apoptosis following treatment with BCM was measured by flow-cytometry using the annexin V-FITC/PI apoptosis kit. Osteogenic differentiation was assessed by measuring alkaline phosphatase activity and intracellular accumulation of calcium and osteocalcin for up to 21 days following exposure to BCM. Expression of genes involved in osteogenic differentiation and osteoclast regulation, were also evaluated by quantitative real-time PCR.

Results: BCM from clinical strains of *S. aureus* reduced osteoblast viability which was accompanied by an increase in apoptosis. Osteogenic differentiation was significantly inhibited following treatment with BCM as indicated by decreased alkaline phosphatase activity, decreased intracellular accumulation of calcium and inorganic phosphate, as well as reduced expression of transcription factors and genes involved in bone mineralization in viable cells. Importantly, exposure of osteoblasts to BCM resulted in up-regulated expression of RANK-L and increase in the RANK-L/OPG ratio compared to the untreated controls.

Conclusions: Together these studies suggest that soluble factors produced by *S. aureus* biofilms may contribute to bone loss during chronic osteomyelitis simultaneously by: (1) reducing osteoblast viability and osteogenic potential thereby limiting new bone growth and (2) promoting bone resorption through increased expression of RANK-L by osteoblasts. To our knowledge these are the first studies to demonstrate the impact of staphylococcal biofilms on osteoblast function, and provide an enhanced understanding of the pathogenic role of staphylococcal biofilms during osteomyelitis.

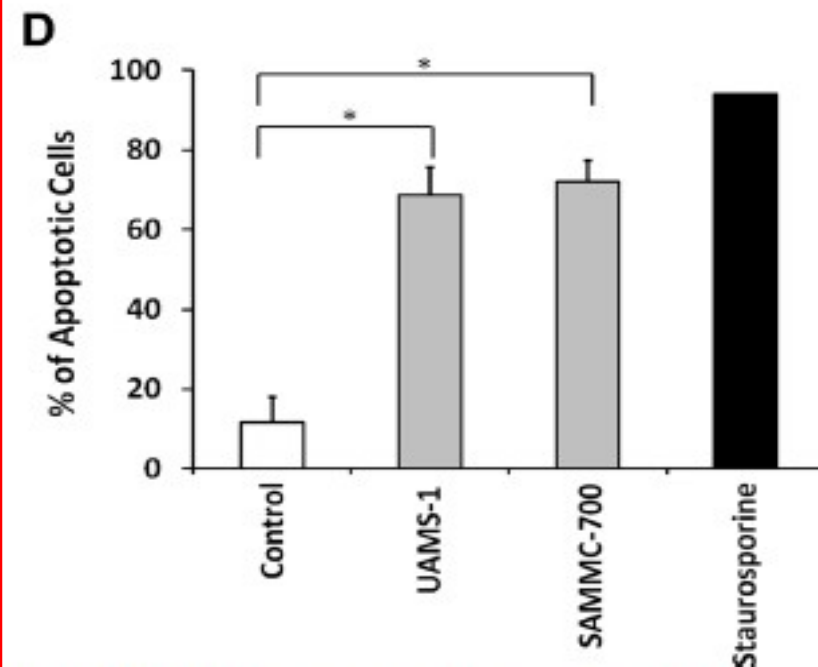
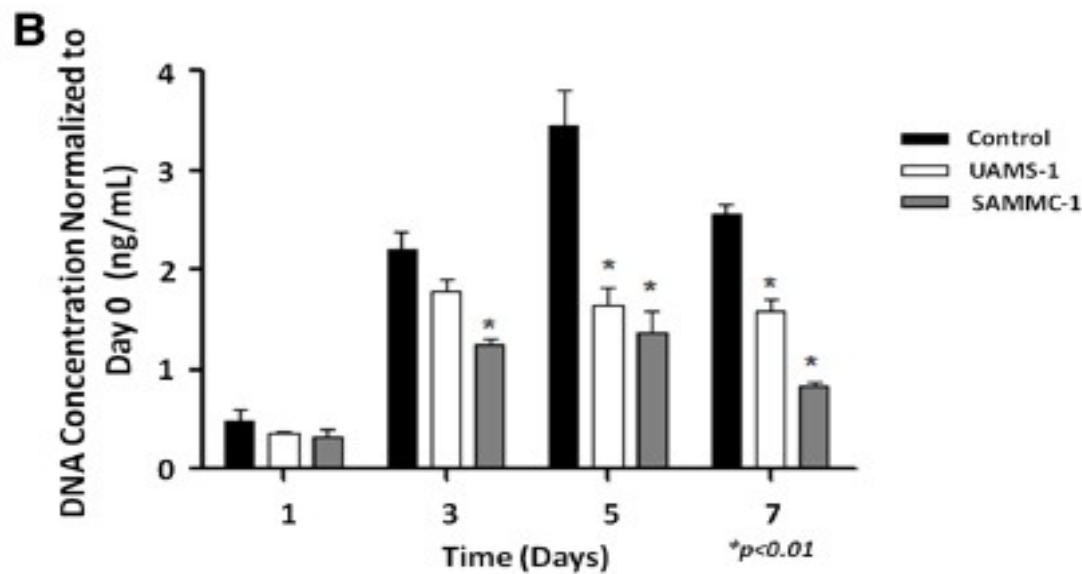
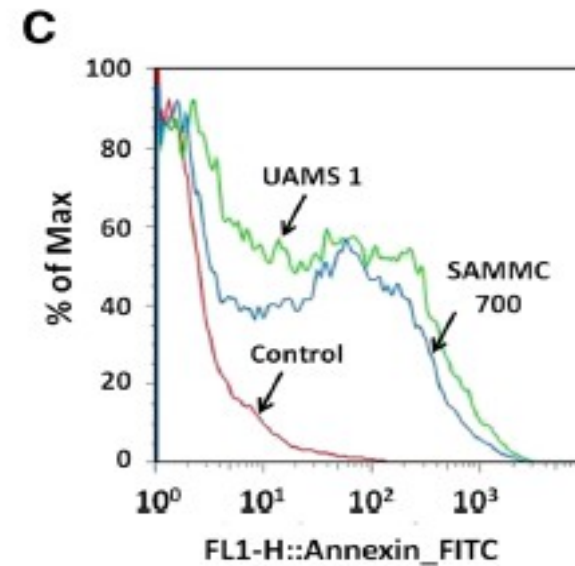
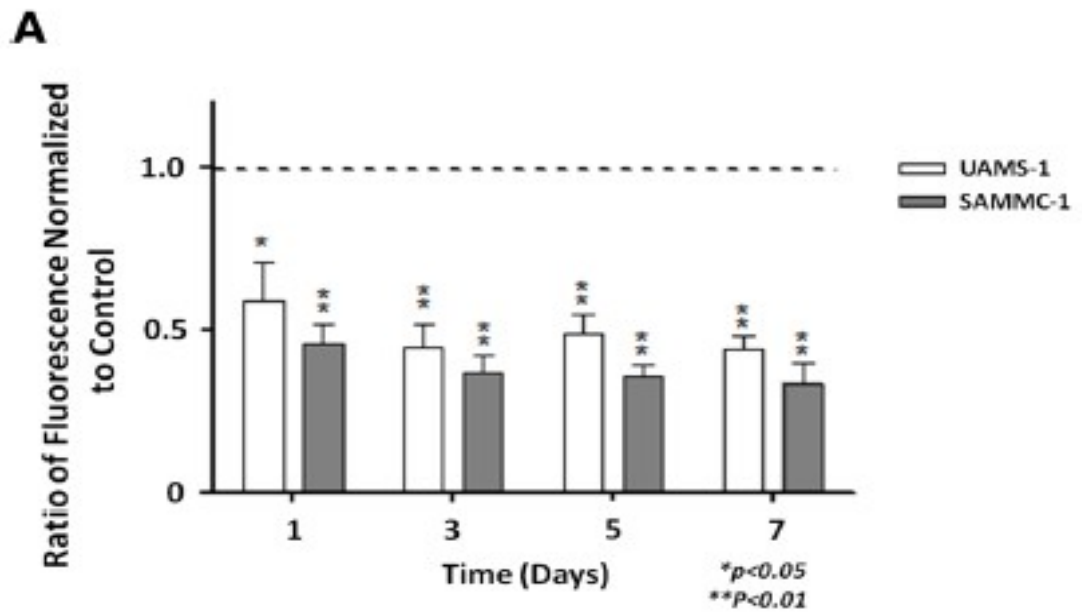


Figure 2 Biofilm factors reduce viability and activate apoptosis in human osteoblasts. A) Viability in osteoblast expressed as ratio of

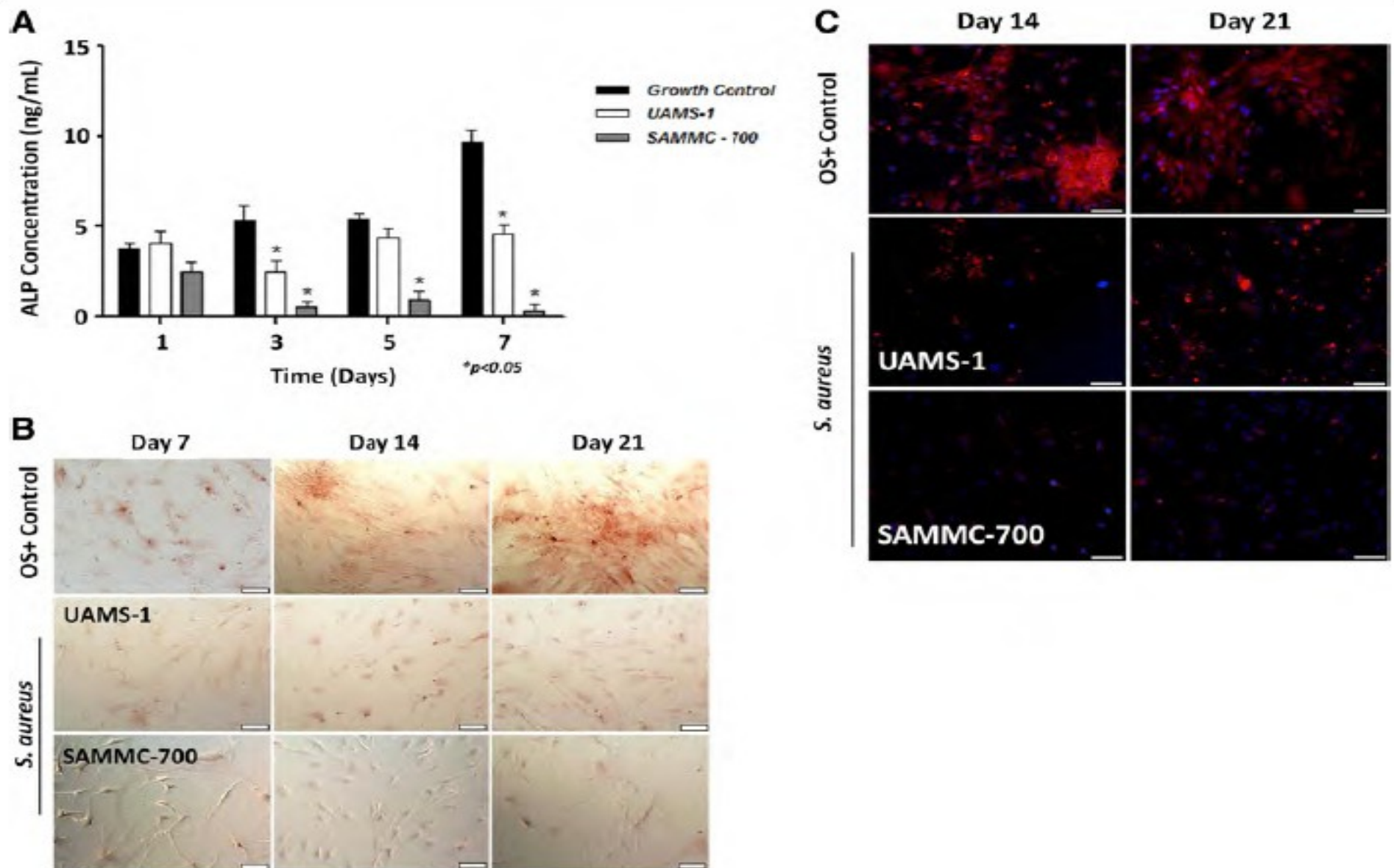
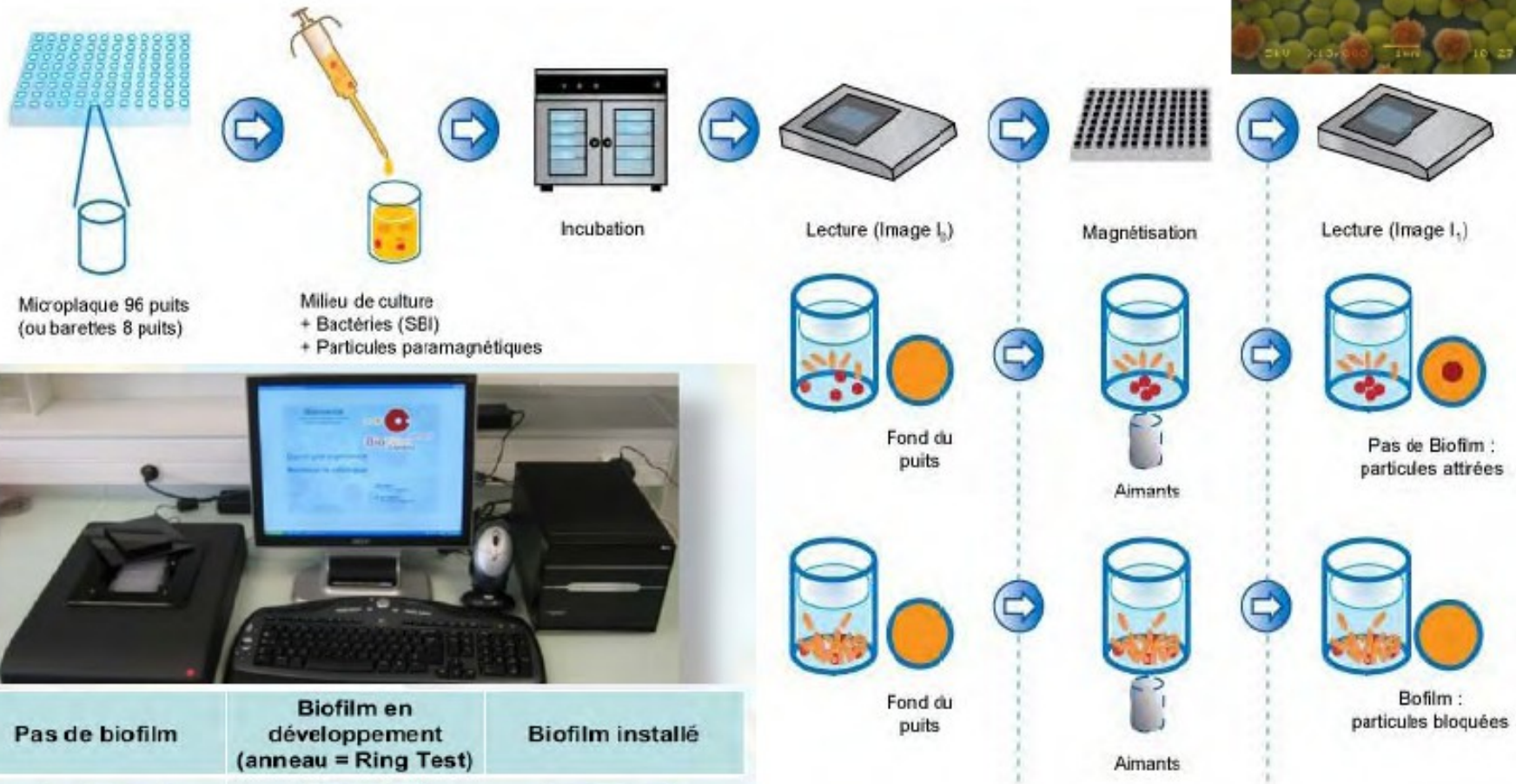
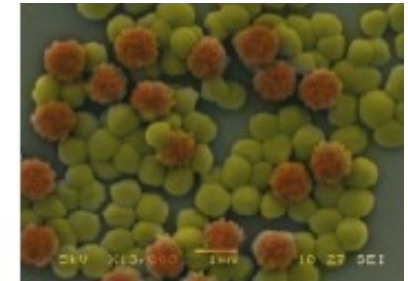


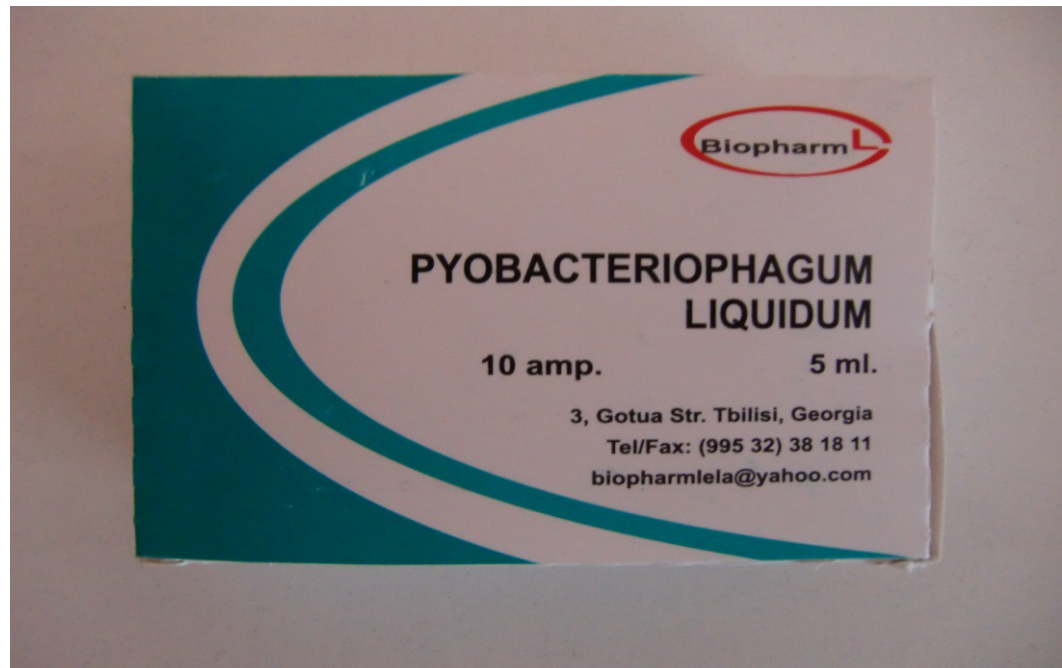
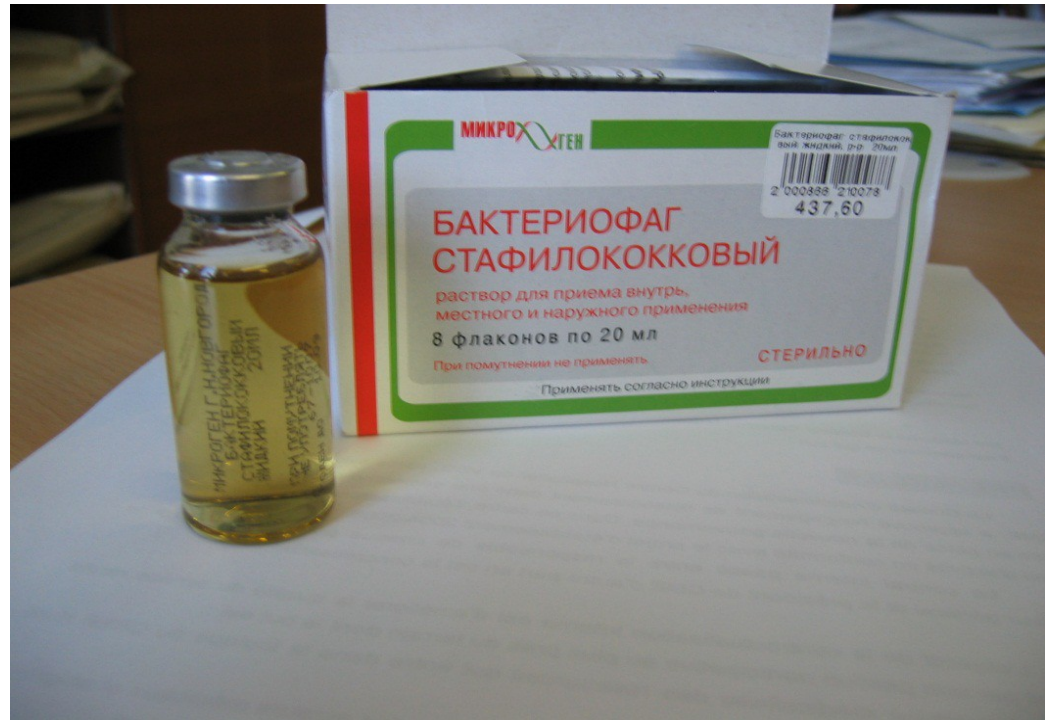
Figure 3 Staphylococcal biofilm factors inhibit osteogenic differentiation in human osteoblasts. **A)** ALP concentration in osteoblasts exposed to BCM. Bars represent the averages \pm std dev from three independent experiments. **B)** Calcium deposition in osteoblasts and **C)** osteocalcin in osteoblasts treated with BCM revealed by Alizarin Red S staining and immunofluorescence using specific antibody, respectively. Images were taken at 10 \times magnification (bars represent 100 μ m). Statistical analysis was performed using a One-Way ANOVA analysis using a Bonferroni test to determine statistical differences between groups.* $p < 0.01$ versus control group.

Mesure de l'installation en biofilm

Modèles expérimentaux statiques

Biofilm Ring Test (BioFilm Control)





PHAGES FORMULATIONS

Bactériophages et chirurgie orthopédique

A propos de sept cas.

G. Lang, P. Kehr, H. Mathevon, J. M. Clavert, P. Séjourne et J. Pointu *

(Strasbourg)

RÉSUMÉ

Les auteurs rapportent sept observations où furent utilisés les bactériophages en chirurgie orthopédique. Ils soulignent l'intérêt de cette thérapeutique dans les cas d'infections chroniques à germes polymésistants. Ce sont toujours des phages adaptés qui ont été utilisés. Le protocole d'utilisation est précisé. Il doit être rigoureux tant dans la chronologie que dans l'exécution des différents gestes. Les résultats obtenus sont très encourageants. Évidemment le bactériophage reste une thérapeutique d'exception mais il peut rendre de très grands services surtout en chirurgie orthopédique quand on connaît la chronicité désespérante des ostéites.

CONCLUSION

L'utilisation de bactériophages adaptés dans le traitement des infections osseuses chroniques polymésistantes aux antibiotiques nous paraît être une solution thérapeutique de secours intéressante. Nos résultats nous encouragent pleinement à poursuivre dans ce sens.

UTILISATION DES BACTERIOPHAGES DANS LE MONDE EN 2015

3 Situations différentes:

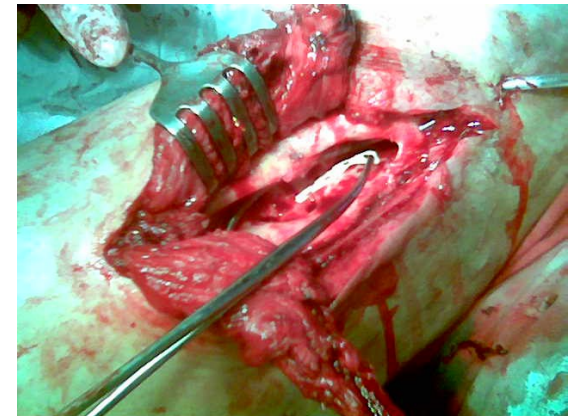
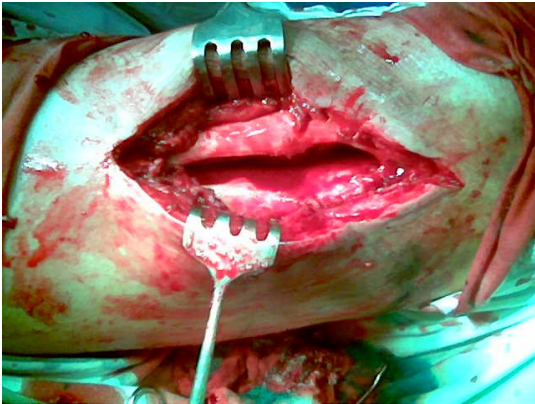
1. pays de l'ex URSS : Géorgie , Russie..
2. La Pologne
3. Autres pays: France, Belgique, Allemagne, Roumanie...



CHRONIC OSTEOMYELITIS

osteo-trepanation at bone points and 4-6 day lavage of cavity with phages
introduction of PhageBioderm and removal of drainages.

Residues of PhageBioderm pieces and powder were found after 3-4 weeks in the healing wound – bacteria reduced 3 logs.



Clinical Aspects of Phage Therapy

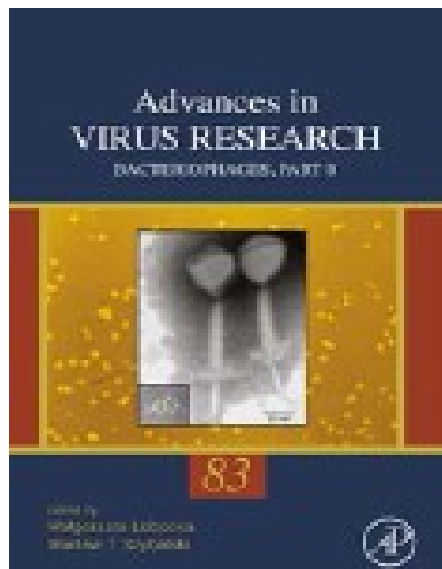
Ryszard Międzybrodzki,^{*,†,‡} Jan Borysowski,[‡]
 Beata Weber-Dąbrowska,^{*,†} Wojciech Fortuna,^{*,†}
 Sławomir Letkiewicz,^{†,§} Krzysztof Szufnarowski,^{†,||}
 Zdzisław Pawełczyk,[†] Paweł Rogóż,^{†,¶} Marlena Kłak,^{*}
 Elżbieta Wojtasik,[#] and Andrzej Górski^{*,†,‡}



[†] Phage Therapy Unit, Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland

TABLE II Status of bacteriophage collection of the Institute of Immunology and Experimental Therapy (May 2011)

Bacteriophage host	Number of phages
<i>Escherichia coli</i>	121
<i>Klebsiella pneumoniae</i> or <i>Klebsiella oxytoca</i>	95
<i>Enterococcus faecalis</i> or <i>Enterococcus faecium</i>	73
<i>Enterobacter cloacae</i>	48
<i>Shigella flexneri</i> or <i>Shigella sonnei</i>	39
<i>Citrobacter freundii</i>	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> or <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
<i>Salmonella enteritidis</i> or <i>Salmonella typhimurium</i>	32
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18
<i>Serratia marcescens</i> or <i>Serratia liquefaciens</i>	17
<i>Proteus mirabilis</i>	17
<i>Morganella morganii</i>	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5
<i>Burkholderia cepacia</i>	2

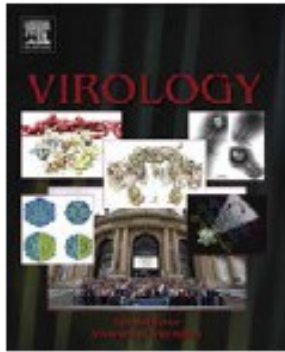


Category of response to treatment	Genital and urinary tract infections in men ^a (n = 29)		Genital and urinary tract infections in women ^b (n = 22)		Soft tissue infections ^c (n = 30)		Skin infections ^d (n = 10)		Orthopedic infections ^e (n = 37)		Respiratory tract infections ^f (n = 24)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	11	37.9	3	13.6	5	16.7	0	0.0	7	18.9	2	8.3
B - good clinical result	2	6.9	0	0.0	2	6.7	2	20.0	3	8.1	3	12.5
C - clinical improvement	1	3.4	5	22.7	4	13.3	1	10.0	7	18.9	2	8.3
D - questionable clinical improvement	2	6.9	0	0.0	2	6.7	0	0.0	3	8.1	3	12.5
E - transient clinical improvement	5	17.2	4	18.2	8	26.7	5	50.0	8	21.6	3	12.5
F - no response to treatment	8	27.6	10	45.5	6	20.0	1	10.0	7	18.9	7	29.2
G - clinical deterioration	0	0.0	0	0.0	3	10.0	1	10.0	2	5.4	4	16.7
Good response (total A–C):	14	48.3	8	36.4	11	36.7	3	30.0	17	45.9	7	29.2
Inadequate response (total D–G):	15	51.7	14	63.6	19	63.3	7	70.0	20	54.1	17	70.8



Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value		Value during PT		p ^a
			Mean	± SE	Mean	± SE	
Erythrocytes (cells × 10 ⁶ /mm ³)	3-6 days	17	4.416	± 0.129	4.453	± 0.147	ns ^b
	7-20 days	103	4.697	± 0.051	4.676	± 0.052	ns
	21-48 days	80	4.723	± 0.062	4.715	± 0.065	ns
	49-84 days	51	4.625	± 0.061	4.598	± 0.064	ns
Hemoglobin (g/dl)	3-6 days	17	13.10	± 0.48	13.17	± 0.48	ns
	7-20 days	103	13.77	± 0.19	13.74	± 0.19	ns
	21-48 days	80	13.78	± 0.21	13.69	± 0.20	ns
	49-84 days	51	13.62	± 0.23	13.56	± 0.23	ns
Hematocrit (%)	3-6 days	17	39.3	± 1.1	39.2	± 1.2	ns
	7-20 days	103	41.3	± 0.5	41.1	± 0.5	ns
	21-48 days	80	41.5	± 0.5	41.2	± 0.5	ns
	49-84 days	51	40.8	± 0.6	40.6	± 0.6	ns
Platelets (cells × 10 ³ /mm ³)	3-6 days	16	243.9	± 18.7	250.1	± 21.3	ns
	7-20 days	99	256.9	± 8.5	254.7	± 8.0	ns
	21-48 days	79	263.9	± 10.2	252.1	± 10.4	<0.01
	49-84 days	51	257.7	± 11.7	256.2	± 11.9	ns
Leukocytes (cells × 10 ³ /mm ³)	3-6 days	17	6.535	± 0.392	6.888	± 0.477	ns
	7-20 days	103	6.941	± 0.185	6.838	± 0.185	ns
	21-48 days	80	6.977	± 0.217	7.056	± 0.260	ns
	49-84 days	51	6.772	± 0.239	6.705	± 0.261	ns
Lymphocytes (%)	3-6 days	15	32.5	± 2.2	30.8	± 2.5	ns
	7-20 days	95	32.2	± 1.0	32.2	± 1.0	ns
	21-48 days	74	33.7	± 1.1	33.4	± 1.1	ns
	49-84 days	49	32.7	± 1.3	31.7	± 1.3	ns
Monocytes (%)	3-6 days	8	6.2	± 1.2	6.9	± 1.2	ns
	7-20 days	61	4.9	± 0.4	5.1	± 0.5	ns
	21-48 days	47	5.3	± 0.5	5.4	± 0.6	ns
	49-84 days	30	5.3	± 0.6	5.0	± 0.6	ns
Neutrophils (%)	3-6 days	15	59.0	± 2.3	61.5	± 3.0	ns
	7-20 days	95	60.1	± 1.0	60.0	± 1.0	ns
	21-48 days	73	58.2	± 1.1	58.7	± 1.2	ns
	49-84 days	49	59.1	± 1.3	60.5	± 1.5	ns
Eosinophils (%)	3-6 days	8	2.3	± 0.7	2.4	± 0.6	ns
	7-20 days	56	2.5	± 0.3	3.0	± 0.3	ns
	21-48 days	45	2.8	± 0.2	2.8	± 0.2	ns
	49-84 days	30	2.2	± 0.2	2.5	± 0.2	ns
Basophils (%)	3-6 days	7	0.2	± 0.1	0.3	± 0.2	ns
	7-20 days	52	0.3	± 0.1	0.4	± 0.1	ns
	21-48 days	41	0.4	± 0.1	0.2	± 0.0	ns
	49-84 days	28	0.3	± 0.1	0.5	± 0.3	ns

Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value		Value during PT		<i>p</i> ^a
			Mean	± SE	Mean	± SE	
Fasting blood sugar (mg/dl)	3-6 days	14	84.6	± 7.6	98.1	± 9.0	<0.05
	7-20 days	92	84.4	± 3.1	93.3	± 1.7	<0.05
	21-48 days	71	82.9	± 3.9	94.5	± 1.5	ns ^b
	49-84 days	46	82.1	± 5.1	96.2	± 2.9	<0.05
Creatinine (mg/dl)	3-6 days	16	0.92	± 0.14	1.01	± 0.14	ns
	7-20 days	91	0.93	± 0.03	0.93	± 0.03	ns
	21-48 days	69	0.90	± 0.02	0.91	± 0.02	ns
	49-84 days	47	0.91	± 0.03	0.93	± 0.03	ns
Total protein (g/dl)	3-6 days	5	7.50	± 0.32	7.31	± 0.33	ns
	7-20 days	10	7.20	± 0.16	7.08	± 0.13	ns
	21-48 days	23	7.24	± 0.11	7.17	± 0.11	ns
	49-84 days	22	7.38	± 0.11	7.39	± 0.12	ns
Total bilirubin (mg/dl)	3-6 days	17	0.57	± 0.05	0.58	± 0.06	ns
	7-20 days	92	0.64	± 0.03	0.66	± 0.03	ns
	21-48 days	72	0.62	± 0.03	0.65	± 0.04	ns
	49-84 days	46	0.56	± 0.03	0.56	± 0.04	ns
Aspartate transaminase (UI)	3-6 days	17	34.0	± 12.9	31.5	± 10.5	ns
	7-20 days	97	24.7	± 2.4	26.1	± 3.0	ns
	21-48 days	71	23.2	± 1.3	24.2	± 1.0	<0.05
	49-84 days	47	21.4	± 0.9	21.8	± 1.2	ns

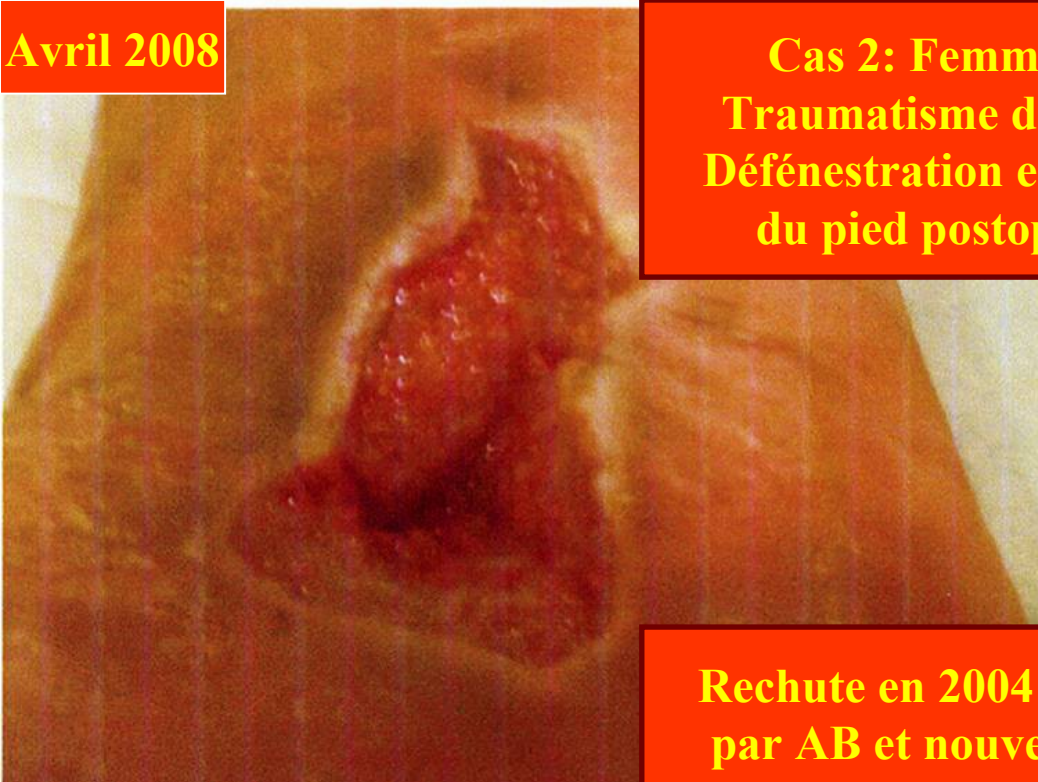


Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh

- ▶ 15 human volunteers
- ▶ T4 phages cocktail (lytic phages)
- ▶ Placebo / Low dose (10^7 PFU/ml) / High dose (10^9 PFU/ml)
- ▶ The 3 treatments in random order – 2 days treatment

- ✚ Phages were detected in 64%, 30%, 28% of stools samples respectively
- ✚ 1% of the orally administered phages recovered in the stools
- ✚ No side effects
- ✚ No impact on the fecal microbiota

Avril 2008



**Cas 2: Femme âgée de 30 ans
Traumatisme de la cheville après
Défenestration en 1995 avec osteite
du pied postopératoire traitée**

Mars 2009



**Rechute en 2004 avec SASM traité
par AB et nouvelle fistulisation en
2006; DRESS syndrome sous AB
en février 2008**



**Réintervention avec
Phagothérapie
antistaphylococcique**

**Juin 2010: asymptomatique,
sans syndrome inflammatoire,
sans antibiotique depuis
mai 2009**

Mai 2009



Nov 2009

**Cas 1: Homme de 45 ans co-infecté VIH/VHC
Polytraumatisme le 10 février 2005 (37 fractures)
avec ostéite chronique du pied à SARM à J30**



**Intervention avec
Phagothérapie en
mars 2008**



Juin 2008



Juin 2009

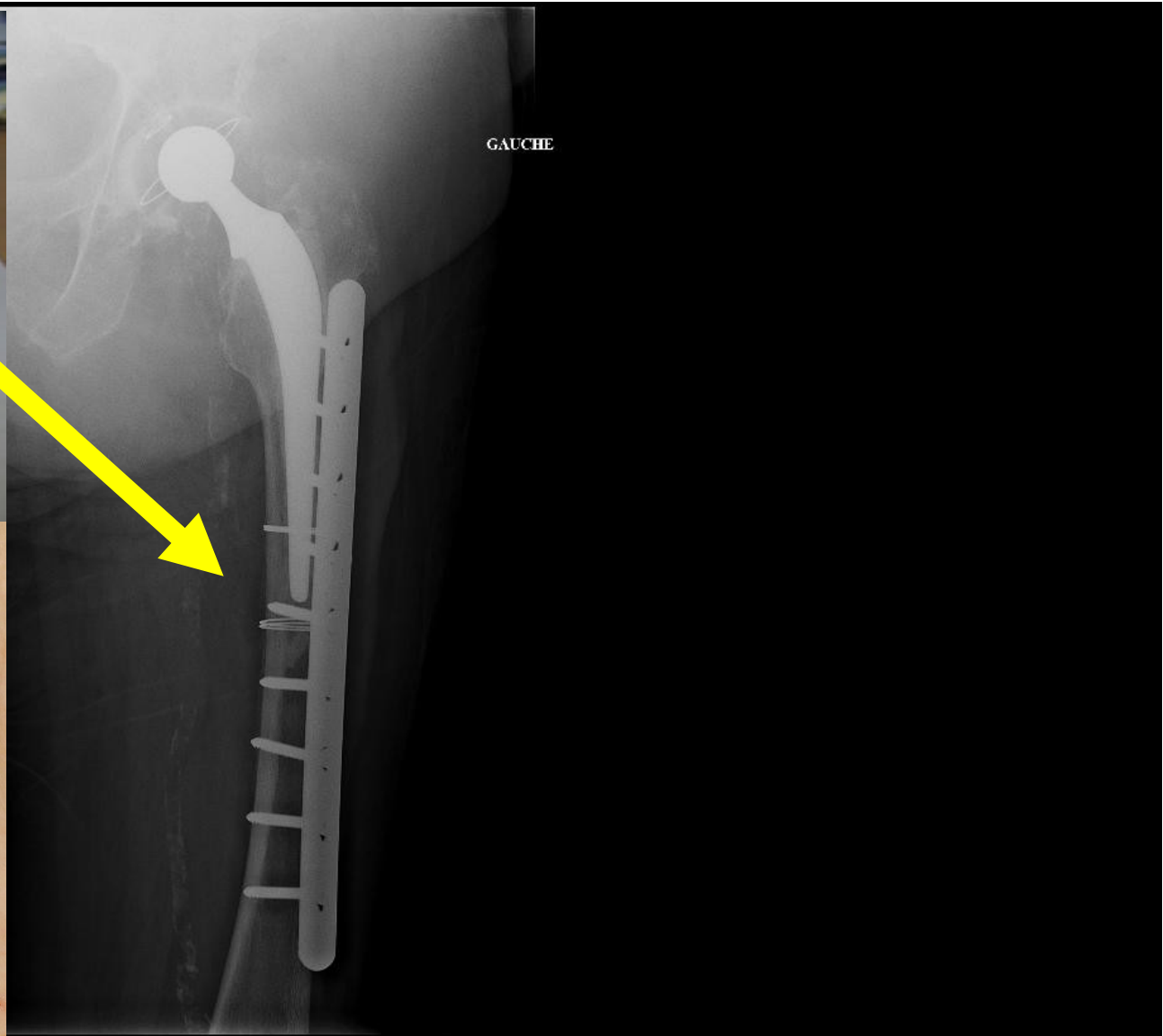


**Disparition des signes
infectieux et fermeture
Progressive de la plaie**



Pour la première fois depuis
presque deux ans je peux
même me baigner !

Eté 2009





**Admission
12/03**



**Intervention
19/03**



**Placement du redon
(19/03)**

**HOPITAL MILITAIRE
REINE ASTRID
BRUXELLES, BELGIQUE**



**Application BFC 1.4 via redon
(21/03)**



Direction générale de l'offre de soins

Centres de référence labellisation, structures spécialisées

DGOS PF2 – v1 - Mai 2012



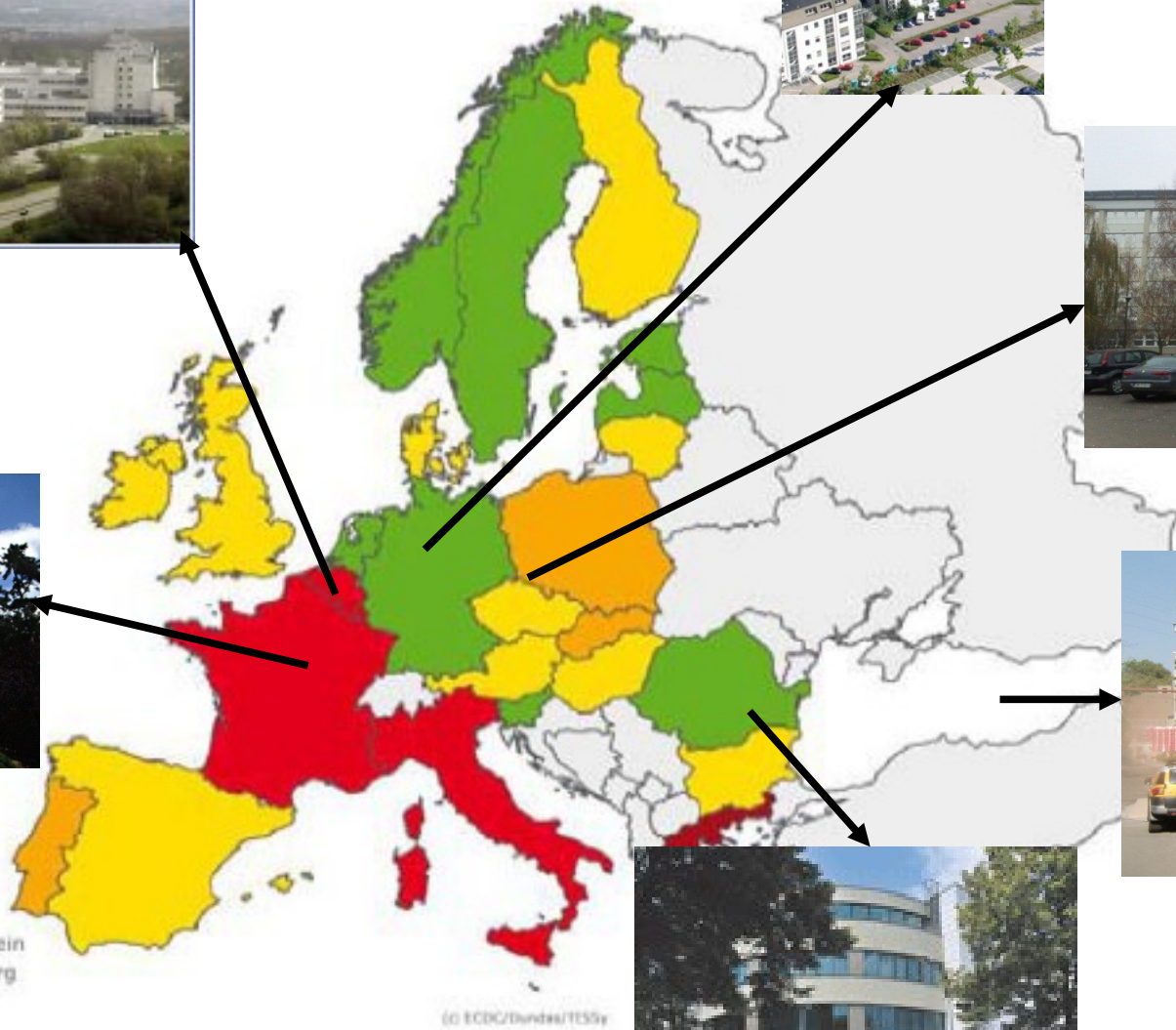
Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DES AFFAIRES SOCIALES
ET DE LA SANTÉ

1. **Mission de prise en charge de recours** de niveau au moins régional ou interrégional, cette prise en charge étant pluridisciplinaire et globale ;
2. **Mission de coordination** : le centre est une tête de pont. Il constitue des filières (d'amont et d'aval) sur son territoire, dresse un annuaire de ses correspondants, assure le lien avec les usagers et l'administration, réalise des actions d'information et de communication ;
3. **Mission d'expertise** : en lien avec la prise en charge de recours, le centre organise des réunions de concertation pluridisciplinaires (RCP). Il assure la réalisation et la diffusion de procédures et protocoles, réalise un recueil épidémiologique. Il s'assure de la qualité des prises en charge et forme les professionnels ;
4. **Mission d'enseignement** : le centre anime, promeut et participe à la réalisation d'enseignements universitaires et post-universitaires ;
5. **Mission de recherche** : le centre anime, promeut et participe à la réalisation de programmes de recherche clinique, translationnelle et fondamentale, sur les soins, en épidémiologie, en matière de qualité ;

De plus, un centre de référence doit être **bien identifié et visible**.

PHAGE THERAPY CENTER



(© ECDC/Duncker/TESSy)

PHAGE THERAPY CENTER



**ELIAVA INSTITUTE
TBILISSI
GEORGIA**



**HIRZFELD INSTITUTE
WROCLAW
POLAND**

EUROPEAN PHAGES BANK

**DSMZ (Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen and Zellkulturen)
GERMANY**



**CHI VILLENEUVE
SAINT GEORGES
FRANCE**



**USA
Eliava Phages NY**



**M BALS INSTITUTE
BUCAREST
ROMANIA ?**



**QUEEN ASTRID
MILITARY HOSPITAL
BELGIAN**

INFECTIONS A *K.pneumoniae* OXA 48

intestiphage *Specific antiKp
oxa 48 phage* *pyobacteriophage*



EN ATTENDANT: OÙ TRAITER?

En Géorgie?

SANTÉ Serge Fortuna a frôlé l'amputation, depuis il milite pour que la phagothérapie soit autorisée

Sa jambe sauvée en Géorgie par des virus guérisseurs

VIDÉO

Les jours après l'amputation, il y a un week-end où l'on se réveille et on se rend compte que la jambe est sauvée. Mais Serge Fortuna ne veut pas se laisser aller à un optimisme qui a changé sa vie. Sur son lit d'hôpital, il se dit que c'est un miracle. Mais Serge Fortuna ne veut pas se laisser aller à un optimisme qui a changé sa vie. Sur son lit d'hôpital, il se dit que c'est un miracle. Mais Serge Fortuna ne veut pas se laisser aller à un optimisme qui a changé sa vie. Sur son lit d'hôpital, il se dit que c'est un miracle.



Quelques jours après l'amputation, il y a un week-end où l'on se réveille et on se rend compte que la jambe est sauvée. Mais Serge Fortuna ne veut pas se laisser aller à un optimisme qui a changé sa vie. Sur son lit d'hôpital, il se dit que c'est un miracle. Mais Serge Fortuna ne veut pas se laisser aller à un optimisme qui a changé sa vie. Sur son lit d'hôpital, il se dit que c'est un miracle.

« J'ai demandé l'amputation, lettre de motivation à l'appui »

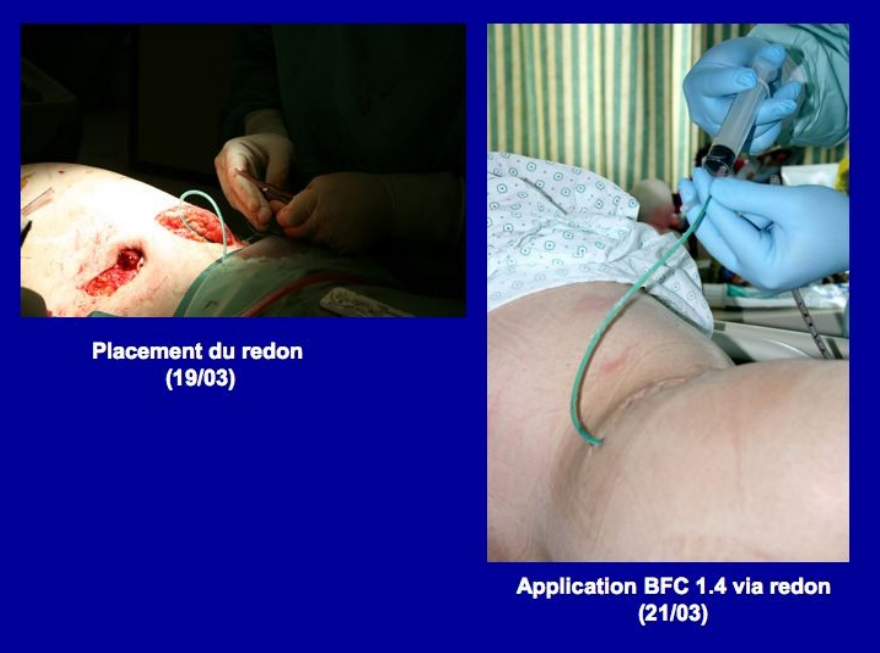
Serge Fortuna prépare sa prochaine voyage, se dirige cette fois-ci vers la phagothérapie en Géorgie. « Je ne vois plus d'autre solution que de partir en Géorgie ».

« Je ne vois plus d'autre solution que de partir en Géorgie ».

Dans l'Union Européenne?



noizaimba 801517



Placement du redon (19/03)

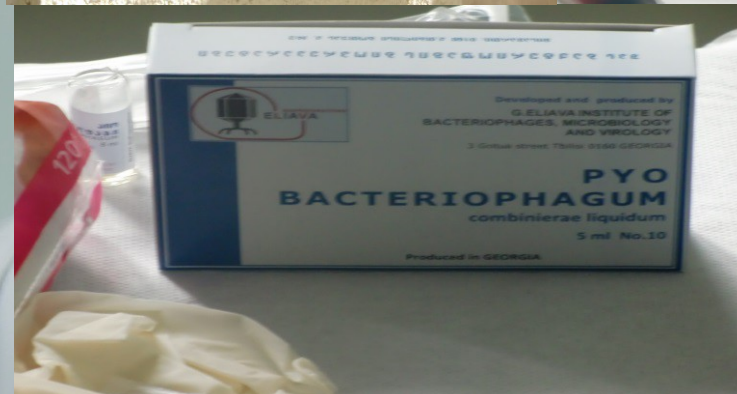
Application BFC 1.4 via redon (21/03)



« TOURISME MEDICAL »



- | | |
|--|---|
| Formellement déconseillé | Vigilance renforcée |
| Déconseillé sauf raison impérative | Vigilance normale |







GROUPE ETUDE PHAGOTHERAPIE OS STAPHYLOCOQUES GEPOS

COORDONNATEURS : O. Patey et A. Dublanchet (CHIV)

PHOSA coordonnateur : J.Gabard

isolement et production

**Phérécydes Pharma
(J.Gabard, F.Pouillot)**

interaction bacteries biofilm

**Biofilm contrôle
(T.Bernardi)**

microbiologie

**CNR Staphylocoques
(F. Laurent, T.Ferry)**

modèles animaux

**Vivexia
(D.Croisier)**

**Faculté de médecine Nantes
(J. Caillon, D. Boutoille)**

**protocoles humains
investigateur principal :
co-investigateur principal
clinique
microbiologie**

**infections osseuses
M.Dupon (Bordeaux)**

**Pied diabétique
A.Sotto (Nîmes)
JP Lavigne (microbiologie)**

**O. Patey
A.Dublanchet**

**O.Patey
A.Dublanchet**

PROJETS

STAPHYLOCOQUES ET OS



Cocktail de bactériophages pour lutter contre certaines infections bactériennes ostéo-articulaires provoquées par *Staphylococcus (aureus et epidermidis)*

PHAGOS

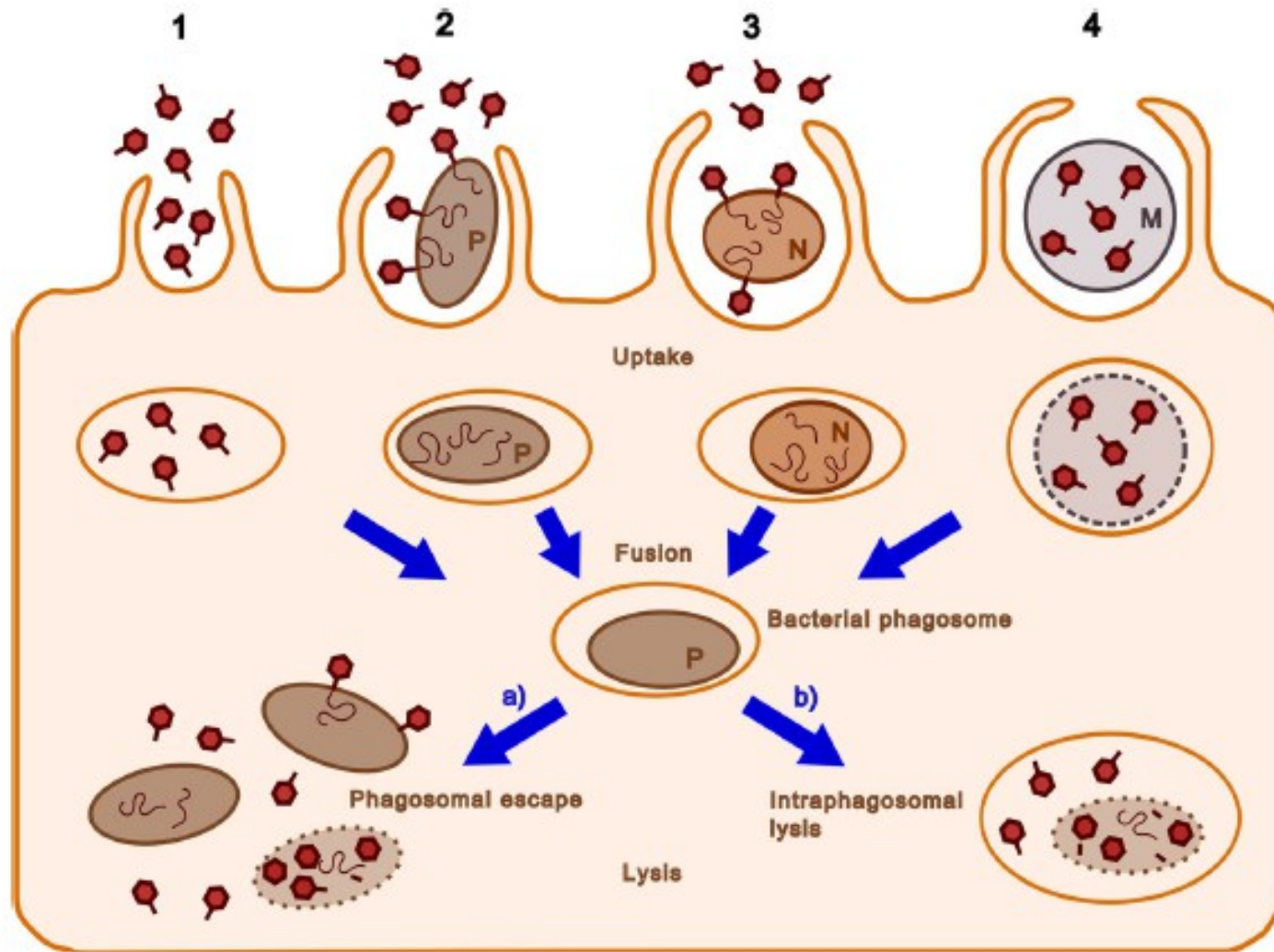


PHAGOPIEDS



A Question of Attire: Dressing Up Bacteriophage Therapy for the Battle Against Antibiotic-Resistant Intracellular Bacteria

Anita Nieth · Cyprien Verseux · Winfried Römer



FDA approved products

(GRAS status i.e. Generally Recognized as Safe)

- 2006 August - **ListShield™** ready-to-eat meat and poultry products, Intralytix, USA
- 2006 October - **Listex P100**, EBI Food Safety, Netherlands
- 2011- **EcoShield** against *E.coli O157*



2006 - AgriPhage, Omnilytics, EPA registration

2014 : SALMONEX



NÉCESSITE D'UNE SURVEILLANCE ÉCOLOGIQUE

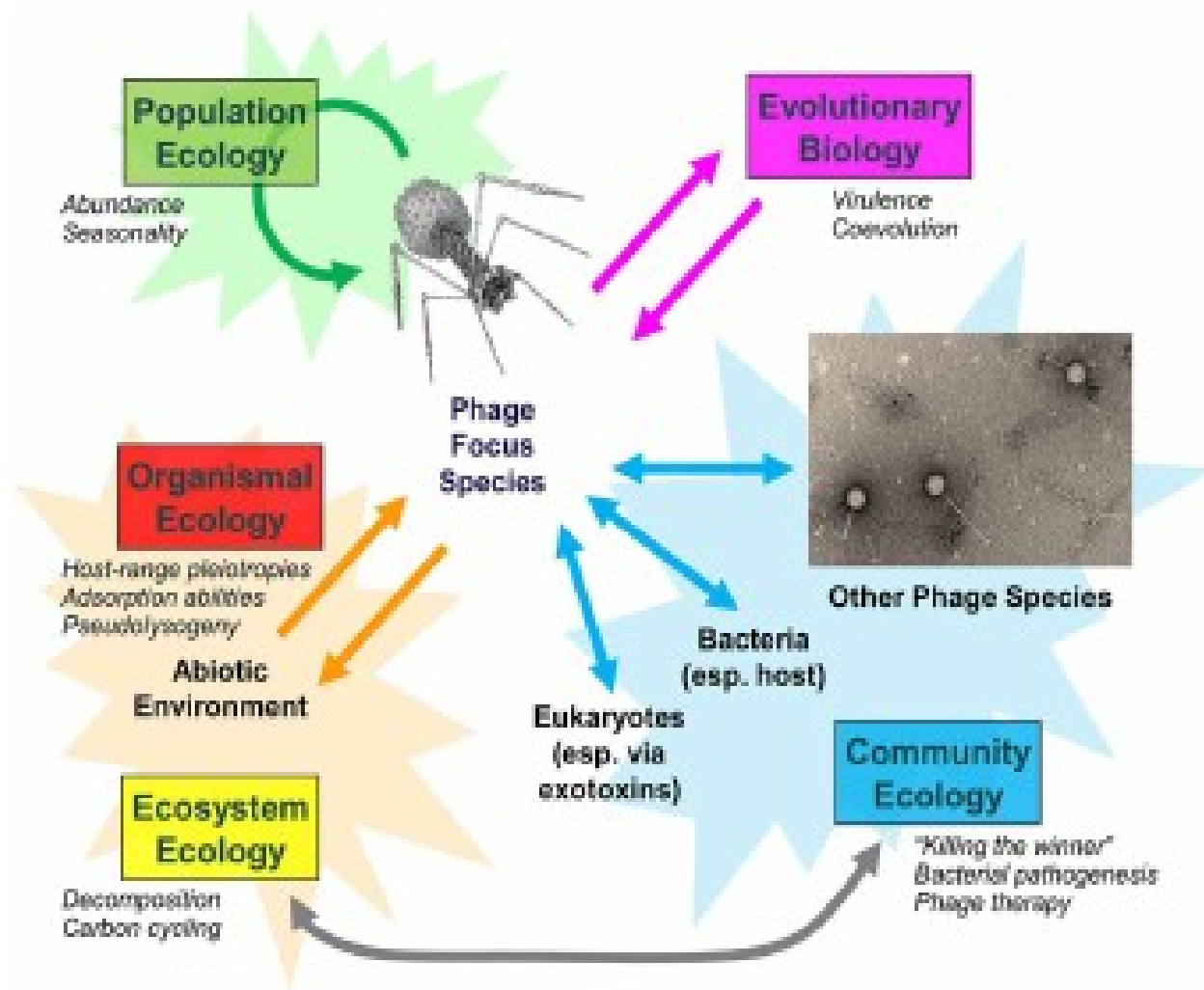
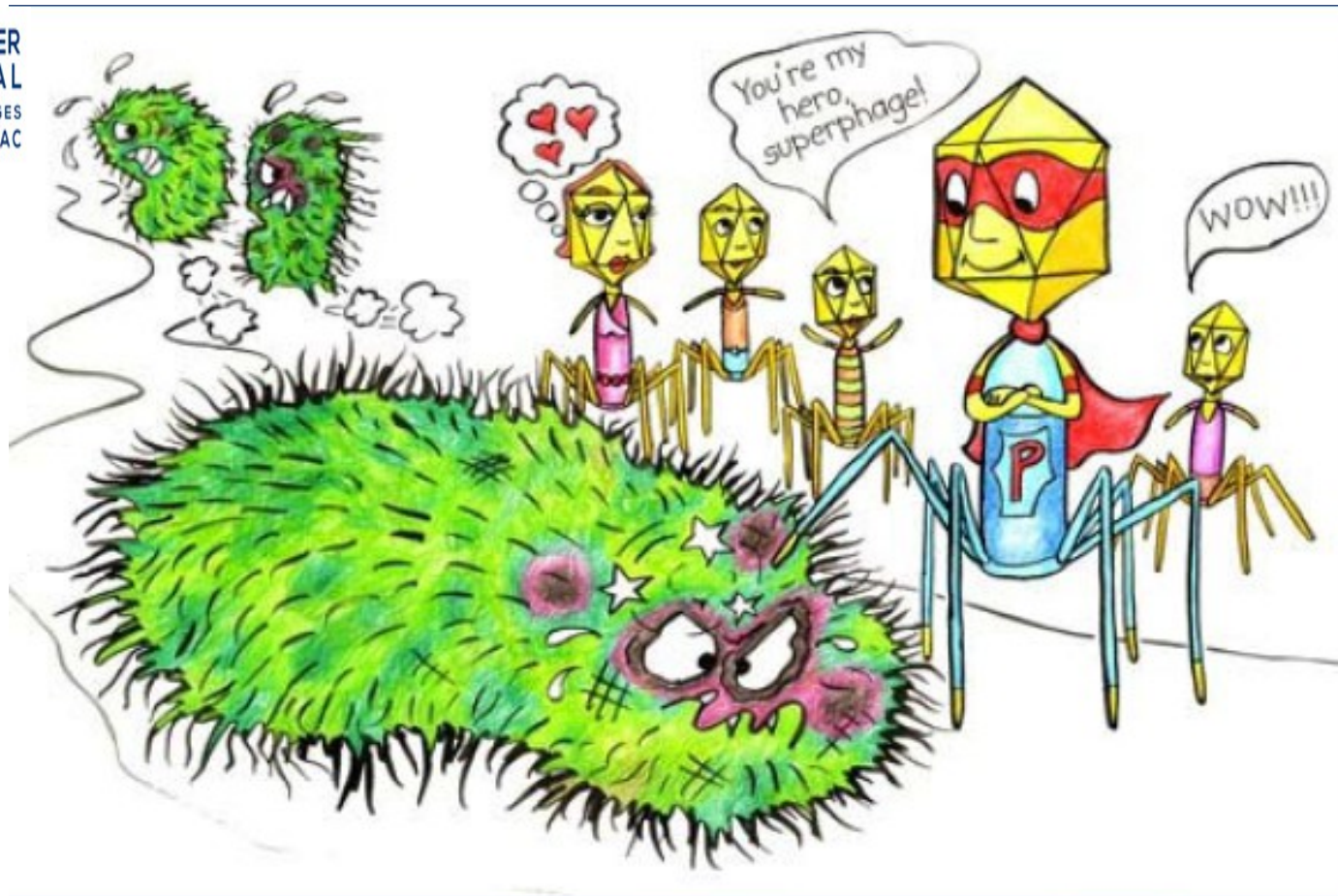


FIGURE 1 | Bacteriophage population, community, and ecosystem impacts. Examples of phage-associated changes are italicized. Adapted from Abedon (2009).



P-H-A-G-E.org

Phages for Human Applications Group Europe vzw
Militair Hospitaal Koningin Astrid
C DIS/Site NOH, Blok C, 1ste verdieping
Lokaal 1.391
Bruynstraat 1
1120 BRUSSEL



LA PHAGOTHÉRAPIE

une réponse à l'antibiorésistance

DE LA NÉCESSITÉ D'UN CADRE RÉGLEMENTAIRE

Colloque à l'Assemblée nationale

jeudi 19 novembre de 14h à 17h30

Salle COLBERT

En présence de la ministre de la Santé Marisol TOURAINE – sous réserve –

INTRODUCTION Jean-Louis ROUMÉGAS (député) et Olivier PATEY (professeur infectiologue, chef de service à Villeneuve-Saint-Georges)

1^{re} PARTIE La situation de l'antibiorésistance

Modératrice : Professeure Françoise BALLEREAU (CHU Nantes)

► **État actuel de l'antibiorésistance**

(Dominique MONNET, ECDC Stockholm)

► **Les impasses thérapeutiques dans les infections bactériennes**

(Jean CARLET, consultant à l'OMS)

QUESTIONS-RÉPONSES AVEC LA SALLE

2^e PARTIE Les bactériophages thérapeutiques comme solution à l'antibiorésistance ?

Modératrice : Michèle RIVASI (députée européenne, biologiste agrégée)

► **Les phages, mode d'action, développements thérapeutiques et surveillance**

(Alain DUBLANCHET, CHI Villeneuve-Saint-Georges)

► **Aspects réglementaires de la production**

(Jean-Paul PIRNAY, Hôpital Reine Astrid, Bruxelles)

TABLE RONDE (avec un représentant de l'ANSM, Michèle RIVASI, Serge JENNES – Hôpital Reine Astrid, Bruxelles)

3^e PARTIE Quelle organisation pour le bon usage de la phagothérapie, développement scientifique et réglementaire pour la phagothérapie

Modérateur : Patrick JAULT (Hôpital HI, Percy)

► **Une réponse nationale : les centres de références**

(Olivier PATEY, CHI Villeneuve Saint-Georges)

► **Organisation au niveau européen : réseau de CNR**

(unE représentantE réseau européen maladies rares) – sous réserve –

TABLE RONDE (Maryvonne BLONDIN, sénatrice, Patrick JAULT)

CONCLUSION QUI PEUT FAIRE QUOI ET QUAND ?

Michèle RIVASI (députée européenne, professeure agrégée en SVTU, ancienne élève de l'École normale supérieure de Fontenay-aux-Roses) et Alain DUBLANCHET (microbiologiste, ancien chef de service à l'hôpital de Villeneuve-Saint-Georges)

