

Nouveaux regards sur la phagothérapie

1^{ère} partie *

A. DUBLANCHET¹, O. PATEY¹

RÉSUMÉ

Le développement des résistances bactériennes et la rareté des nouveaux antibiotiques mettent de plus en plus fréquemment la médecine moderne devant des situations d'échecs thérapeutiques. La recherche de solutions dites « alternatives » est sollicitée par les médecins et encouragée par les pouvoirs publics. Une des solutions envisagées est la phagothérapie, dont le principe actif est constitué de virus susceptibles de détruire les cellules bactériennes : les bactériophages. Avec l'aide de la biologie moléculaire et sous certaines conditions, il apparaît que la phagothérapie pourrait apporter aujourd'hui une réponse non seulement « alternative » mais « complémentaire ». Des techniques dites « omiques » sont capables d'analyser très rapidement des populations entières, et d'élucider comment ces populations communiquent entre elles. Plusieurs découvertes issues de ces approches sont autant d'éléments qui plaident en faveur d'une phagothérapie moderne, mieux comprise et maîtrisée. De nombreuses pathologies infectieuses pourraient bénéficier de cette nouvelle voie thérapeutique, mais cela nécessite que la réglementation soit adaptée et que l'industrie pharmaceutique soit en capacité de produire de tels « biomédicaments ».

MOTS-CLÉS : bactériophage, phagothérapie, antibiothérapie, infection bactérienne, infection nosocomiale, résistance aux antibiotiques, biofilm.

I. - INTRODUCTION

La phagothérapie, c'est-à-dire l'utilisation des bactériophages pour traiter des infections bactériennes, a connu un développement mondial entre les années 1920 et 1940 (1). Avec l'apparition des antibiotiques, cette thérapeutique anti-infectieuse a progressivement été abandonnée au profit de l'antibiothérapie, qui s'est imposée pendant un demi-siècle. La convergence de l'extension des résistances bactériennes et de la pénurie actuelle de nouveaux antibiotiques, fait craindre depuis une ou deux décennies un retour à une ère pré-antibiotique (3). Aussi, de nouvelles solutions ne cessent d'être réclamées par les professionnels (4). De nouveaux antibiotiques majeurs, s'ils existent, ne devraient pas être disponibles à court terme (5, 6). Aujourd'hui, le problème est tel que les pouvoirs publics s'en sont saisis, annonçant un nouveau et troisième plan national sur les antibiotiques (http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Plan_antibiotiques_2011-2016_.pdf).

Cette situation ne se limite pas à notre pays ni même à l'Europe car les praticiens d'outre-Atlantique, tout comme l'Organisation mondiale de la santé (OMS), alertent également régulièrement sur ce sujet (5, 7).

Face à cette problématique, les réponses font appel à des procédés, soit anciens et qui ne peuvent avoir la prétention d'y remédier (8), soit modernes (peptides, nanoparticules, inhibiteurs (9)) et qui nécessitent des développements longs et coûteux avant d'envisager une

* Le présent article est publié en deux parties. La seconde partie paraîtra dans le prochain numéro. Pour compléter son information sur la phagothérapie, le lecteur est invité à consulter deux articles des mêmes auteurs parus dans notre revue (1, 2).

¹ Service de Médecines Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Intercommunal, 40 allée de la Source, 94190 Villeneuve-Saint-Georges, France.

utilisation médicale. Fin 2012, dans un rapport, le Centre d'Analyse Stratégique (CAS) avait souligné la nécessité de définir les priorités en matière de recherche (10) et plaidé en faveur de la phagothérapie. Certains proposent d'utiliser les bactériophages pour traiter des impasses thérapeutiques, tandis que d'autres se demandent ce qu'il manque pour que la phagothérapie devienne une réalité (11), et passent en revue les récents développements (12) et les concepts attachés au traitement (13), voire déjà les aspects cliniques de la phagothérapie (14). Signalons au passage que ces préoccupations ne sont pas réservées à la santé humaine, mais concernent aussi la santé animale (15, 16) dans le nouveau concept de maîtrise globale des maladies infectieuses.

Pendant presque un siècle, la phagothérapie a été empirique, sans que le principe actif ait été complètement étudié et ses applications médicales correctement maîtrisées. Ces insuffisances ont été responsables pour une bonne part de son désintérêt dans les pays occidentaux. Aujourd'hui, diverses méthodologies permettent de poser des indications bien précises et de définir des applications mieux codifiées. La phagothérapie présente la particularité de se situer à la charnière de deux époques et de promettre des solutions aussi nombreuses que variées. Associées aux progrès biologiques qui révèlent chez les bactériophages des propriétés jusqu'ici mal perçues ou même insoupçonnées, de nouvelles données justifient la réhabilitation de cette approche dans un contexte moderne. Poussés par la nécessité de découvrir d'autres moyens que l'antibiothérapie, et incités par les études récentes et approfondies des bactériophages, patients et médecins souhaitent utiliser la phagothérapie, qui semble pouvoir devenir une réelle solution et ne plus être considérée comme une thérapeutique du passé.

Dans cette revue, nous privilégierons la présentation des nouveautés parues depuis le début des années 2010. Certaines publications, bien qu'étant encore « sous presse », ont pu être consultées et apparaissent dans la bibliographie.

II. - ÈRE DES « OMIQUES »

À partir des années 1940 et pendant un demi-siècle, les bactériophages ont contribué au développement de la biologie moléculaire comme outils biotechnologiques, en tant que vecteurs de gènes ou d'aides au séquençage des génomes. Cette biologie s'est appuyée sur l'analyse des structures et des mécanismes biologiques en avançant des hypothèses que le chercheur s'est appliqué à vérifier. Dans un premier temps, la biologie a été purement descriptive et réductionniste (un gène, un ARN messager, une protéine). Alors que l'on décrivait des **microflores** essentiellement dans leurs composantes bactériennes, aujourd'hui, l'analyse des **microbiotes** fait l'inventaire de tous les microorganismes et révèle des mécanismes variés et complexes.

Encadré 1 - Termes avec le suffixe « omique ».

Les technologies et sciences « omiques » sont des stratégies d'études récentes qui ont bénéficié d'avancées technologiques considérables ces dernières années. Leurs noms dérivent souvent des objets qu'elles se proposent d'analyser.

Génomique

Science qui étudie le fonctionnement d'un organisme, d'un organe, d'une cellule, à l'échelle du génome, et non plus limitée à celle d'un seul gène. Elle se divise en deux branches :

- la *génomique structurale*, qui repose sur le séquençage du génome entier ;
- la *génomique fonctionnelle*, qui détermine la fonction et l'expression des gènes séquencés (transcriptome, protéome).

Métagénomique

Également appelée « génomique environnementale » ou « génomique des communautés », la métagénomique est l'étude des métagénomes, c'est-à-dire de l'ensemble du matériel génétique extrait directement d'un échantillon environnemental. Elle repose sur le séquençage complet (séquençage de masse ou en en profondeur) de l'ADN appliqué à tous les microorganismes contenus dans l'échantillon sans identification préalable, permettant d'obtenir une liste quasi exhaustive des diverses espèces microbiennes en présence.

Épigénomique

Étude de l'ensemble des modifications épigénétiques (épigénome) d'une cellule, c'est-à-dire des mécanismes moléculaires ayant lieu au niveau du génome et de la régulation de l'expression des gènes qui peuvent être influencés par l'environnement et l'histoire individuelle (ainsi qu'être potentiellement transmissibles d'une génération à l'autre). Ces modifications interviennent sans altération des séquences nucléotidiques (ADN), et avec un caractère réversible.

Transcriptomique

Science qui étudie l'ensemble des ARN messagers (ARNm) produits lors du processus de transcription d'un génome. Comme pour la métagénomique, cette étude est réalisée par le séquençage complet des ARNm contenus dans un échantillon environnemental.

Métabolomique

Science récente qui étudie l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule, un organe, un organisme. Elle utilise la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

Protéomique

Science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines exprimées au sein d'une cellule, d'un organe, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. On distingue la protéomique fonctionnelle, qui consiste en l'étude de la fonction des protéines, de la protéomique structurale, qui s'attache à étudier leur structure primaire, secondaire et tertiaire. La protéomique utilise la spectrométrie de masse, souvent couplée à de la chromatographie en phase liquide.

En effet, depuis une dizaine d'années, de nouvelles technologies sont en train de révolutionner les processus d'études du vivant en permettant des analyses à haut débit, voire à très haut débit. En utilisant ces technologies, des approches dites « **omiques** » (« *omics* » en anglais) permettent d'étudier simultanément un grand nombre de gènes, de protéines ou de métabolites sans *a priori* sur leurs fonctions et autorisent à explorer à un rythme accéléré de vastes domaines de la biologie. Il est ainsi possible d'analyser des systèmes microbiens complexes présents

dans l'environnement ou chez des êtres vivants tels que l'homme. Les données produites, d'un volume considérable, sont analysées à l'aide de techniques informatiques puissantes et adaptées à cette nouvelle discipline : la bioinformatique (17).

Les principales technologies de types « omiques » sont la **génomique**, la **transcriptomique**, la **protéomique** et la **métabolomique** (Encadrés 1 et 2), néologismes construits à partir de termes connus auxquels sont accolés le suffixe « **omique** ». Des résultats issus de ces approches sont de plus en plus présents dans les revues scientifiques et médicales internationales. Depuis quelques années, les approches « omiques » constituent même de véritables disciplines et ont leurs revues spécifiques, qui publient sur les méthodes et les ressources dans le domaine scientifique bien entendu, mais aussi dans le domaine juridique et éthique. On se fera une idée du nombre rapidement croissant d'études s'appuyant sur les « omiques » à l'examen du graphique de la **figure 1**, qui présente le nombre annuel d'articles dans lesquels le suffixe « omique » apparaît dans le titre ou le résumé. On doit se préparer au fait que les développements dans la recherche biologique et bioanalytique conduiront à des changements de paradigmes par la compréhension fine des organismes vivants (populations, espèces, individus, cellules, virus, etc.) et de leurs rôles respectifs dans de larges ensembles. La comparaison des systèmes commence à souligner les différences entre les états normaux et pathologiques, et conduira éventuellement à des interventions correctives. Ainsi, dans un proche avenir, on peut s'attendre à des applications débouchant sur une médecine personnalisée.

Plus précisément, au sein d'un **microsystème**, les bactériophages sont associés à d'innombrables **microorganismes** (bactéries, virus, etc.) pour constituer un microbiote qui est soumis à des conditions environnementales dynamiques. Beaucoup de microorganismes entrant dans la composition de microbiotes n'ont jamais été identifiés mais peuvent être détectés par **métagénomique**, c'est-à-dire un ensemble de techniques qui permettent une description globale des génomes (microbiome, virome, phagéome). Actuellement, on estime que moins de 1 % des bactéries détectables par métagénomique sont cultivables par des approches classiques. Une étude de « séquençage en profondeur » des acides nucléiques provenant de populations microbiennes contenues dans des eaux d'égout a permis d'identifier 234 virus connus, dont 17 à tropisme humain ; des bactériophages étaient également présents (18). Cependant, la grande majorité des séquences retrouvées ne correspondent à aucun virus connus et ne sont donc pas identifiables. On peut ainsi en déduire que l'univers viral est très vaste et diversifié, et que la grande majorité des virus – dont les bactériophages – n'ont pas encore été caractérisés.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux permettent d'analyser le rôle joué par certains bactériophages, non plus isolément mais au sein de différents microsystèmes dont ceux rencontrés chez l'homme. Le corps

Encadré 2 - Termes avec le suffixe « omie ».

Épigénome

Ensemble des modifications de la chromatine qui interviennent dans la régulation de l'expression du génome, sans altération de la séquence de l'ADN. Chaque type cellulaire a son propre génome et son propre épigénome. Il peut évoluer au cours du temps et dans des contextes pathologiques.

Génome

Ensemble des gènes d'un organisme.

Métabolome

Ensemble des métabolites associés à un ensemble d'une espèce pure ou d'un mélange d'espèces différentes (sur les mélanges, on emploie parfois le terme « méta-métabolome »). La métabolomique est l'ensemble des techniques qui permettent de le définir.

Métagénome

Contrairement au génome, le métagénome représente l'ADN de tous les membres d'une communauté d'espèces différentes. C'est un terme souvent utilisé pour désigner l'ensemble de l'ADN provenant d'un échantillon environnemental. La métagénomique est l'ensemble des techniques qui permettent de le décrire.

Méatranscriptome

Terme parallèle au métagénome, mais qui désigne l'extrait total des ARN d'un échantillon environnemental. Il s'agit essentiellement des ARNm et des ARNt. Du fait des courtes demi-vies des ARN, le méatranscriptome varie généralement plus rapidement dans le temps que le métagénome.

Microbiome

Désigne l'ensemble des microorganismes (bactéries, virus, etc.) présents dans un environnement spécifique. Par exemple, le microbiome intestinal désigne les microorganismes d'un tractus intestinal. La composition de ce microbiome varie d'un individu à l'autre et pour un même individu selon l'étage du tube digestif dans lequel il est contenu.

Microbiote

Ensemble qui décrit un mélange de microorganismes (autrefois microflore). Ne pas confondre avec microbiome qui correspond au microbiote et à son environnement spécifique, c'est-à-dire une « aire de vie ».

Mobilome (sic !)

Ensemble des éléments génétiques mobiles d'un génome.

Pathobiome

Sous-ensemble du microbiome constitué par les espèces microbiennes pathogènes opportunistes.

Phagéome

Sous-ensemble du virome constitué exclusivement par les bactériophages (virus de bactéries).

Protéome

Sous-ensembles du métabolome constitués de la totalité des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme sans distinction d'état (libres ou complexés). On parle de **glycome** pour les glucides et de **lipidome** pour les lipides.

Résistome

Ensemble des gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques dans un environnement donné.

Transcriptome

Ensemble de tous les ARN, sans distinction, issus de la transcription du génome : ARN messagers (ARNm), ARN ribosomiques (ARNr), ARNs de transfert (ARNt) et autres espèces d'ARN.

Virome

Sous-ensemble du microbiome constitué exclusivement par les virus.

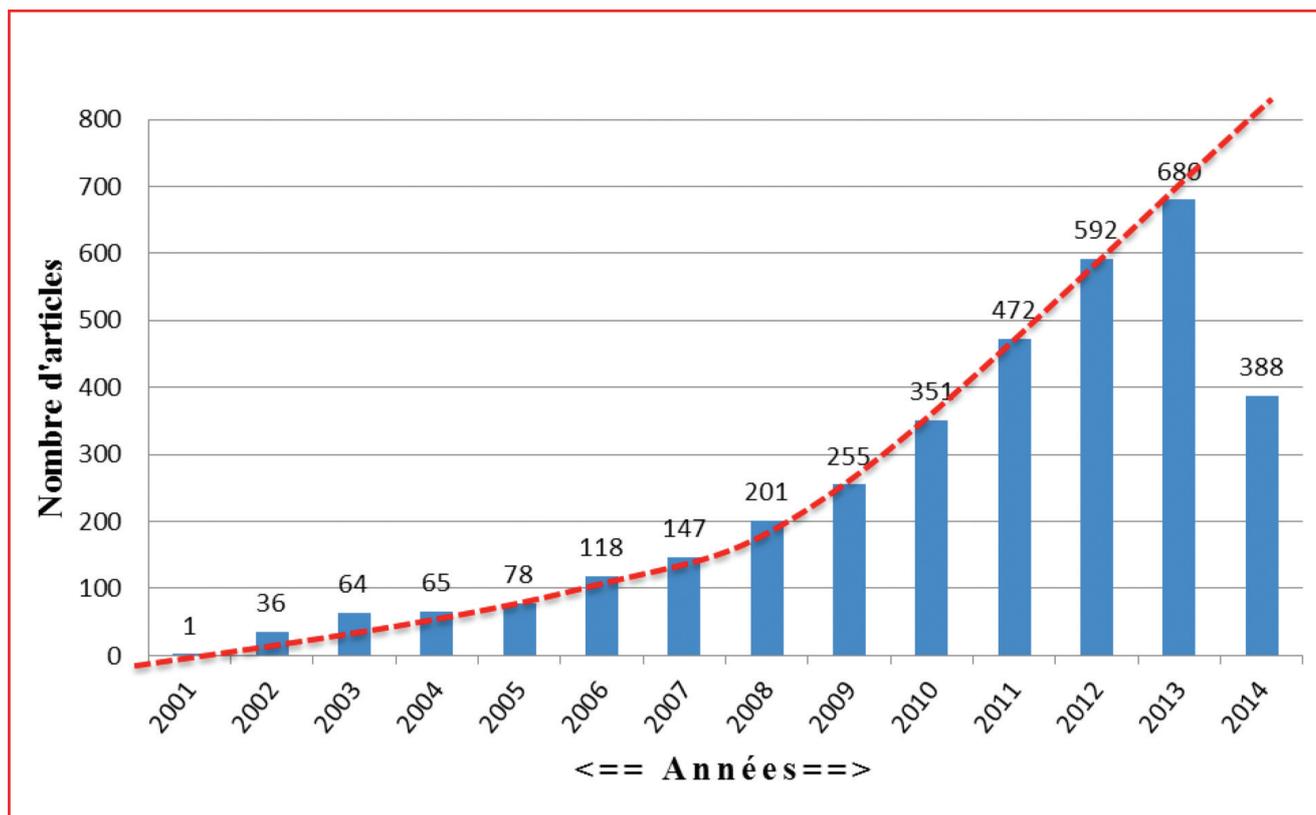


Fig. 1 - Nombre d'articles de la base de données Medline contenant le terme « omics » dans le titre ou le résumé (pour 2014 : 6 premiers mois).

humain et plus généralement les êtres vivants sont en effet colonisés par des communautés microbiennes spécifiques à chaque environnement anatomique (intestin, peau, vagin, etc.) (19). On commence à entrevoir qu'un certain nombre de pathologies sont l'expression du déséquilibre d'un véritable système écologique auquel les bactériophages participent. La connaissance précise des mécanismes physiopathologiques dans lesquels ils interviennent permettra des applications optimisées. Ainsi les bactériophages, dans une certaine mesure, sont susceptibles de maîtriser les bactéries pathogènes et si les rôles respectifs de chacun de ces éléments ne sont pas encore clairs, des études de la coévolution expérimentale des populations suggèrent qu'ils jouent un rôle central dans l'élaboration dynamique des **microflores** (20, 21). Malheureusement, encore aujourd'hui, le faible nombre de séquences de génomes de bactériophages en référence dans les bases de données publiques reste un obstacle à la compréhension de leurs fonctions exactes dans les microbiomes. À ce jour, on considère en effet que moins de 0,002 % des variétés existantes sont représentées. À titre d'exemple, consulté le 29 avril 2014, le site « NCBI » ne comportait que 5 386 séquences de référence correspondant à 3 980 génomes viraux. Avec la puissance des nouvelles techniques, le nombre de plus en plus important de publications, et l'intérêt croissant pour ce domaine, gageons que ce déficit sera prochainement comblé et qu'il sera ainsi possible d'évoluer vers une approche plus holistique de l'écologie microbienne, permettant une meilleure compréhension des

acteurs microscopiques présents dans tous milieux associés à la vie et à ses dérèglements (22). Comme souligné par certains auteurs, cela passera par une meilleure standardisation des méthodologies de types « omiques » (23).

III. - FAITS NOUVEAUX

A) Bactériophages et activité lytique

La puissance destructrice d'un bactériophage lytique sur une bactérie peut être évaluée par plusieurs paramètres qui ont été déterminés, mais qui n'ont pas révélé tous leurs secrets et dont nombre d'entre eux restent encore peu étudiés (24, 25). S'il est possible d'examiner l'influence de ces paramètres *in vitro* au laboratoire, il est difficile, voire illusoire, de l'envisager *in vivo* pour certains d'entre eux comme l'accessibilité des récepteurs bactériens ou la pharmacocinétique – non linéaire – des bactériophages. Bien que difficilement appréciables par des mesures *in vivo*, ces paramètres sont néanmoins importants pour comprendre la variabilité des essais de la phagothérapie. Dans un contexte bien contrôlé, c'est ainsi que la productivité (« *burst size* ») d'un bactériophage T4 est trois fois plus importante quand il attaque une bactérie juste avant sa division comparativement à une bactérie jeune (26). Cependant, démontré concernant l'attaque d'*Escherichia coli* par le phage T4, cela reste à confirmer pour d'autres bactéries et d'autres phages. On comprend aussi qu'il n'est pas envisageable d'optimiser ce facteur en cours de traite-

ment, pas plus que le rapport du nombre respectif de bactéries et de bactériophages (MOI, pour « *Multiplicity Of Infection* »), qui conditionne le rendement optimum de la lyse *in vitro*. Plus réalisable par contre, comme constaté empiriquement depuis longtemps, est l'entraînement des bactériophages sur la souche bactérienne isolée de l'infection. Appelé encore exaltation ou adaptation, ce processus d'entraînement consiste à effectuer des passages sériés pour sélectionner les bactériophages les plus actifs sur la bactérie qui est ciblée. Observée cliniquement, l'adaptation des bactériophages par entraînement a été récemment démontrée expérimentalement (27). Il semblerait que ce phénomène adaptatif naturel coévolutif (28) soit un atout majeur pour la phagothérapie et pourrait expliquer certains de ses échecs s'il n'est pas mis à profit avant le traitement.

B) Bactériophages et bactéries

Dans le vaste univers du monde vivant, l'un des facteurs importants réside dans les interactions que les bactériophages établissent avec les bactéries. Du fait de leur abondance dans le monde du vivant, il n'est pas étonnant que de nombreuses études récentes aient mis en lumière l'influence des bactériophages sur notre environnement. Malheureusement, étant donné l'extrême diversité et la complexité des communautés microbiennes, les analyses traditionnelles ne pouvaient pas caractériser ces interactions. De nouvelles approches les étudient au sein de réseaux plutôt qu'individuellement (29). Les bactériophages constituent l'un des acteurs clés qui façonnent la taille, la composition, la structure et le développement des communautés bactériennes, par la pression de prédation qu'ils appliquent continuellement sur les bactéries.

En réponse à cette menace, les bactéries développent une batterie de stratégies de défense pour se protéger et survivre (30). Une fonction, la détection du quorum (en anglais « *quorum sensing* ») (31, 32), en permettant un véritable dialogue entre bactéries, a pour conséquence de contrôler l'expression des gènes selon la densité de la population. Ce dialogue constitue une stratégie générale que les bactéries mettent en jeu pour leur protection et c'est un facteur déterminant face à l'attaque d'un bactériophage. Comme cela se rencontre chez certains animaux socialisés, l'une de ces réponses serait celle du suicide altruiste (33, 34). Ainsi, une bactérie infectée libère des substances létales pour elle-même afin d'empêcher le bactériophage de disposer de sa machinerie métabolique et de se développer. En réponse, certains bactériophages semblent cependant capables de bloquer ce mécanisme suicidaire qui empêcherait leur multiplication (35).

De nombreuses autres possibilités pour se prémunir contre une infection ont été développées par les bactéries, défenses auxquelles les bactériophages trouvent généralement une parade (36). La plus intéressante de ces joutes est certainement celle qui implique le système *CRISPR/Cas* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/*

CRISPR associated), qui est un système sophistiqué très répandu chez les bactéries et qui constitue une véritable protection immunitaire adaptative contre l'introduction d'un ADN étranger (37). Une fois encore, en retour, les bactériophages ont su inhiber cette protection (38).

Il serait utile de comprendre le fonctionnement de toutes ces extraordinaires parades défensives pour, si possible, les maîtriser à notre profit. Mais il faut avoir à l'esprit que si les microbiotes évoluent au fil du temps avec l'apparition de nouvelles espèces bactériennes, ils sont aussi sous l'influence d'interactions avec le système immunitaire et d'éventuelles interventions thérapeutiques. Il y a eu encore, notre perception de l'attaque d'un bactériophage se limitait à la description macroscopique et microscopique de la lyse bactérienne. Aujourd'hui, la connaissance de ces mécanismes évolutifs devrait permettre à la phagothérapie de rebondir à un moment crucial. Une revue récente à laquelle nous renvoyons le lecteur fait le point sur ce sujet dans un article au titre (traduit) évocateur : « Les bactériophages : un rôle sous-estimé dans la santé humaine et animale ? » (39).

Le **microbiome** intestinal est plus particulièrement l'objet d'études (40), sans que l'intérêt du sujet semble devoir être épuisé rapidement. L'établissement et le maintien d'interactions bénéfiques entre l'hôte et ses microflore, comme au sein de celles-ci entre bactéries et bactériophages, sont indispensables pour la santé de l'hôte en intervenant sur son système immunitaire, le développement de ses organes, sa physiologie et son métabolisme. Les mécanismes moléculaires de ces interactions entre l'hôte et les microorganismes demeurent encore largement inconnus, mais des études récentes ont commencé à identifier des signaux qui participent à la régulation homéostatique entre le microbiote intestinal et son hôte (41). Par exemple, si des transferts de mécanismes de résistance au cours d'une antibiothérapie sont suspectés depuis longtemps, on sait aujourd'hui qu'un traitement antibiotique favorise des interactions plus fortes dans les échanges bactériophage-bactérie, ce qui facilite les échanges géniques dans un mécanisme communautaire qui protège la microflore intestinale fonctionnelle (42). Ces nouvelles notions justifieraient-elles les pratiques qui utilisaient les antibiotiques comme compléments alimentaires et permettraient-elles d'envisager leur remplacement par des agents non-antibiotiques inoffensifs et tout aussi efficaces (43) ? D'autres microbiomes que le microbiome intestinal ont également été analysés : microbiomes de la peau (44), de la cavité buccale (45), de la cavité vaginale (46), du pharynx (47). Si l'appareil respiratoire a fait l'objet de nombreuses études génomiques (48), la description complète et dynamique de son virome et plus encore celle du **phagème**, restent à faire dans différentes situations.

En bref, l'intérêt des produits élaborés par les bactériophages

Depuis une décennie, outre l'étude de la lyse, les progrès dans notre compréhension à l'échelle moléculaire de chacune des étapes de l'infection phagique ont été fulgurants. Des produits codés par les bactériophages ont été

isolés, identifiés, et proposés comme armes de substitution aux antibiotiques contre les bactéries. Ils interfèrent spécifiquement avec la machinerie de transcription de la bactérie-hôte au bénéfice du propre développement du bactériophage (49-51). Parmi ces produits, les **endolysines** (52) et les « **holines** » (53, 54), lors de la dernière étape de la reproduction des bactériophages, désorganisent la paroi et la membrane de la bactérie et provoquent la mort de cette dernière. L'intérêt de ces produits a été démontré dans divers modèles expérimentaux chez l'animal et des applications thérapeutiques sont sérieusement envisagées depuis quelques années. Une autre substance a été identifiée dans le bactériophage T7, qui s'attaque au colibacille (55) : il s'agit d'une protéine qui empêche la division de la bactérie, ce qui provoque sa mort. La queue des bactériophages elle-même recèle des propriétés antibactériennes dont les avantages ont été soulignés par des chercheurs (56, 57). Ces découvertes pourraient s'avérer utiles dans la perspective de traiter les agents pathogènes résistants aux antibiotiques.

Cependant, aussi intéressantes qu'elles soient, toutes ces pistes débouchent sur des applications qui utilisent des molécules. Comme les antibiotiques, ces molécules ciblent une étape du métabolisme bactérien et seront probablement métabolisées comme eux, contrairement à la phagothérapie qui utilise des bactériophages lytiques complets. Nous ne nous attarderons donc pas sur leurs applications, pas plus que sur la construction de bactériophages génétiquement modifiés, qui ajoute des objections supplémentaires associées aux « organismes génétiquement modifiés » (OGM). Nous aurons essentiellement un regard sur les connaissances récentes qui ont dévoilé des propriétés jusque-là mal exploitées ou ignorées des innombrables bactériophages naturels.

C) Bactériophages et antibiotiques

La phagothérapie est souvent désignée comme un **substitut** (en anglais « *alternative* ») à l'antibiothérapie, mais certaines potentialités des bactériophages devraient plutôt faire envisager la phagothérapie comme un **complément** (en anglais « *supplement* ») à l'antibiothérapie (58).

1) Effets synergiques

Dans notre précédent article (2), nous avons déjà signalé que des réactions synergiques entre bactériophages et antibiotiques, connues depuis les années 1940, avaient été oubliées. En 2007, l'observation fortuite de plages de lyse autour de certains disques d'antibiotiques (bêta-lactamines et quinolones) a réveillé ce souvenir. Il vient d'être rapporté l'observation de telles synergies *in vitro* objectivées par la diminution des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) sur une souche de *Staphylococcus aureus* avec la gentamicine (59). Chez la souris, dans un modèle de pied diabétique infecté par une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (60), la synergie a été clairement démontrée, puisque les traitements par le linézolide seul ou le bactériophage seul sont moins efficaces que

l'association des deux qui, de plus, accélère le processus de guérison. Cet avantage vient encore d'être confirmé quand le bactériophage et le linézolide sont incorporés à du matériel placé dans du tissu osseux (61). Ces résultats synergiques sont encourageants pour envisager la prévention et/ou le traitement des infections ostéoarticulaires en présence d'implants médicaux. La synergie ne se limite pas au staphylocoque, car elle a aussi été démontrée pour *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*. Une synergie a ainsi été montrée en combinant des concentrations subinhibitrices de gentamicine, de ceftriaxone, de ciprofloxacine ou de polymyxine B, avec des bactériophages spécifiques de *P. aeruginosa* (62). Dans une autre étude *in vitro* (63), avec *E. coli* cette fois, le céfotaxime à des concentrations sublétales a stimulé la production d'un bactériophage T4 (augmentation en taille des plages et de la concentration des bactériophages). En outre, cette même combinaison a considérablement accru l'élimination des biofilms bactériens par rapport au traitement par le céfotaxime seul (64). Le mécanisme à l'origine de cette synergie entre un bactériophage et un antibiotique n'a pas été pour l'instant élucidé au niveau moléculaire. Une des explications avancées impliquerait l'inhibition de la division bactérienne par une protéine phagique (55) qui cible une protéine bactérienne (FtsZ) et mime l'action de certains antibiotiques comme les bêta-lactamines « élongatrices ». Des analyses **métatranscriptomiques** des communautés microbiennes comme celles entreprises pour tenter de comprendre les interactions complexes qui existent dans les infections polymicrobiennes (65), devraient permettre de découvrir d'autres processus de ce type.

In vitro, l'isolement des bactériophages utilise généralement la technique des plages de lyse. L'addition d'un antibiotique permet d'obtenir des plages plus grandes sur la gélose (Figure 2). On attribue généralement cet effet à une stimulation de la production des bactériophages. Cependant, sur une même bactérie, cet effet est variable selon le bactériophage et l'antibiotique. Une étude réalisée chez *S. aureus* (66) n'a montré aucun effet significatif sur la taille des plages de lyse avec des bêta-lactamines et des quinolones, pourtant souvent utilisées pour augmenter la taille des plages sur les boîtes de Petri, tandis que la tétracycline, les kétolidés et surtout le linézolide à des concentrations subinhibitrices, ont apporté des améliorations significatives (jusqu'à 3 fois la taille d'origine). Ces résultats soulignent que l'activité synergique du couple bactériophage-antibiotique sur une souche bactérienne (ici de *S. aureus*) peut être plus ou moins marquée, voire absente. S'il existe une corrélation entre cette observation *in vitro* et les résultats obtenus au cours d'un traitement associant bactériophage et antibiotique(s), ne devrait-on pas utiliser une technique qui rechercherait la meilleure association pour l'établissement du traitement le plus efficace ?

Dans l'ensemble, les études récentes sur les synergies ne sont pas encore nombreuses, l'attention étant plus orientée sur la substitution que sur la complémentarité. Cependant, la possibilité de synergies entre bactério-

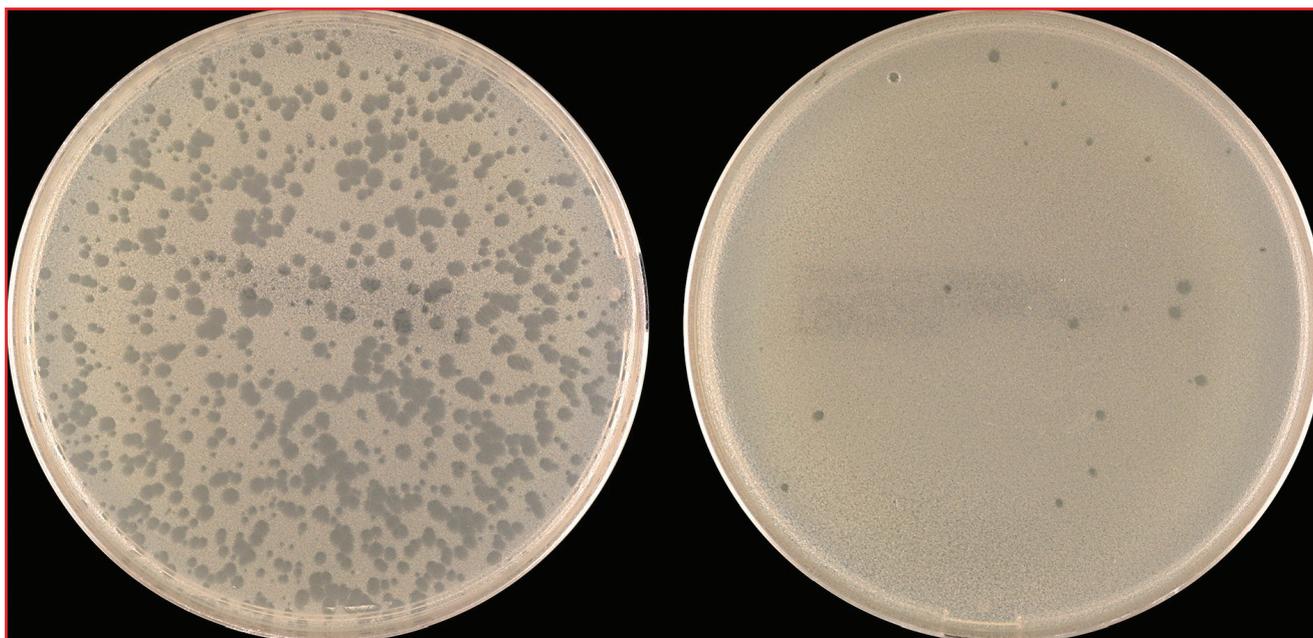


Fig. 2 - Plages de lyse d'un bactériophage sur une souche de *Staphylococcus aureus* (technique de la double couche de gélose). Cliché personnel. Chaque tache correspond au développement d'un bactériophage qui en se développant détruit les bactéries voisines. Après 24 heures, il en résulte un "trou" dans la culture en nappe du staphylocoque (à gauche très nombreuses plages de lyse ; à droite 15 plages environ. Leur dénombrement rapporté à la dilution initiale des bactériophages permet leur numération).

phages et antibiotiques, même en présence de faibles concentrations d'antibiotiques, ouvre des perspectives intéressantes. Un double traitement permettrait ainsi de limiter l'apparition de mutants résistants, ce qui constituerait un réel avantage pour combattre les bactéries dans certains sites où les antibiotiques diffusent mal. On pourrait aussi envisager un raccourcissement du temps de traitement, comme souvent constaté dans notre pratique et suggéré par l'étude citée précédemment (62). Néanmoins, comme il s'agit d'un phénomène variable selon l'association bactériophage-antibiotique, une étude préalable *in vitro* sera nécessaire.

2) Restitution de la sensibilité par les bactériophages

Les bactériophages tempérés pouvant transférer des gènes étrangers, pourquoi ne pas utiliser de tels bactériophages pour introduire des gènes qui confèreraient la sensibilité à des bactéries résistantes ? Il a été rapporté (67) que les résistances à la streptomycine et à l'acide nalidixique pourraient être supprimées chez *E. coli* à l'aide d'un bactériophage tempéré génétiquement modifié pour qu'il introduise dans cette bactérie des gènes dominants de sensibilité. Une diminution des valeurs de CMI a été observée pour les deux antibiotiques après l'intégration du bactériophage modifié dans le génome d'*E. coli*, bien que les gènes de résistance aient été conservés. Même si ce type d'approche pose la question de l'utilisation de bactériophages OGM, ce travail n'en reste pas moins encourageant.

Une autre stratégie pourrait être l'utilisation de bactériophages « plasmide-dépendants » qui n'infectent que des bactéries contenant des plasmides conjuguatifs (68). Étant donné que de nombreuses bactéries résistantes abritent

de tels plasmides porteurs des gènes de résistance aux antibiotiques, leur élimination sélective bloquerait le transfert horizontal des résistances. Cette démonstration a été réalisée avec le transfert du bactériophage PRD1 entre une souche d'*E. coli* sensible et une autre souche multi-résistante sous la sélection d'un antibiotique utilisé à des concentrations non létales (69). Ces bactériophages plasmides-dépendants pourraient conforter un traitement antibiotique empirique et empêcher que les concentrations d'antibiotique subinhibitrices favorisent le transfert de résistances aux antibiotiques d'une bactérie à une autre au sein des microbiomes humains. Cela vient d'être réalisé avec un bactériophage lytique capable de se reproduire dans une large gamme de bactéries à Gram négatif abritant un plasmide de résistance à la kanamycine, l'ampicilline et la tétracycline (69). Le bactériophage a fait perdre aux bactéries leur capacité de conjugaison, même en présence des antibiotiques auxquels le plasmide confère la résistance. Ainsi, même en présence d'une pression de sélection d'un antibiotique, il semble possible d'éviter la sélection de souches résistantes en « combattant l'évolution par l'évolution » avec l'aide de bactériophages adéquats.

D) Bactériophages et biofilms

De nombreuses bactéries, dont les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine, produisent des biofilms. Le biofilm est l'accumulation naturelle d'un ou de plusieurs suborganismes, incorporés dans une matrice polymérique acellulaire qui adhère à une surface, biologique ou non. La physiologie des bactéries associées à un biofilm (dites sessiles) diffère profondément de leurs homologues libres (dites planctoniques) : elles sont dans un écosystème fermé, ont accès à des ressources nutritives

limitées et expriment un phénotype particulier. Le biofilm, présent dans 65 à 80 % des infections, en particulier au cours des infections chroniques, joue un rôle délétère dans les traitements en favorisant la résistance microbienne. Traditionnellement, un laboratoire de microbiologie isole des bactéries pour les étudier dans un état planctonique, et les données qui en résultent peuvent donc avoir peu de pertinence quand les bactéries en cause vivent au sein de biofilms.

Il faut souligner que le biofilm est une **structure dynamique**. Sur une surface, des dépôts de protéines (fibrinogène, albumine et globulines) permettent à des bactéries de se fixer. Très rapidement, comme évoqué plus haut, des molécules élaborées par les bactéries déclenchent un processus de « *quorum sensing* » : les bactéries émettent des signaux qui leur permettent de communiquer entre elles au sein de la même espèce, mais aussi entre espèces différentes, ce qui fait de ce processus un authentique comportement social adaptatif. Les cellules bactériennes se diversifient et se spécialisent pour permettre à l'ensemble de la population bactérienne de résister aux conditions environnementales. On observe, en particulier, la sécrétion de polymères bactériens à la base du biofilm. Véritable structure vivante hydratée, le biofilm est composé d'environ 15 % de cellules bactériennes et 85 % de matériel acellulaire. Il est systématiquement présent dans les plaies chroniques (ulcères), les infections des voies respiratoires, les infections du tractus gastro-intestinal et du tractus uro-génital. Au cours des infections, des biofilms ont été observés dans pratiquement tous les tissus et organes du corps humain, y compris les tissus mous, et sur les corps étrangers (prothèses, cathéters, etc.).

Il est difficile d'éliminer les microorganismes présents dans un biofilm, car ils sont moins accessibles et plus résistants aux antibiotiques (bactéries persistantes). De plus, le système immunitaire de l'hôte peut ne pas les reconnaître. Si les mécanismes « classiques » de la résistance des bactéries aux antibiotiques ont été étudiés dans leurs moindres détails, de nouveaux mécanismes propres aux biofilms ne cessent d'être découverts. Ces mécanismes, qui peuvent se cumuler, sont les suivants :

- 1 - Pénétration lente ou incomplète des agents antimicrobiens à travers la matrice du biofilm ;
- 2 - Acquisition de mécanismes de résistance par transferts, facilitée par les contacts au sein du biofilm ;
- 3 - Modifications du métabolisme bactérien, conduisant à un état de bactéries peu actives et insensibles à différents antibiotiques.

On peut espérer que la compréhension de ces mécanismes permettra de développer des tactiques innovantes. Quoiqu'il en soit, la meilleure stratégie serait de lutter contre le biofilm. Dans notre article précédent (2), nous avons avancé que certains bactériophages avaient une action inhibitrice ou destructrice sur les biofilms. Avec l'optique de réhabiliter la phagothérapie, il n'est pas étonnant que la recherche se soit focalisée sur cette propriété

des bactériophages et qu'elle se soit considérablement amplifiée ces dernières années. Il a ainsi été montré qu'il serait possible d'utiliser un bactériophage pour protéger un cathéter central (70), mais l'une des premières indications retenues est la lutte contre les surinfections de la mucoviscidose, notamment par *P. aeruginosa*. L'action directe sur la bactérie a été l'objet de nombreux essais expérimentaux probants dont le succès est attribué à l'action lytique sur la bactérie. Mais on pourrait également envisager que certains bactériophages puissent se comporter comme de véritables agents d'immunité (71), comme cela a été démontré pour la muqueuse intestinale. Des auteurs, travaillant *in vitro* avec différents échantillons humains et animaux, ont découvert que la capsid des bactériophages affichait des protéines « *immunoglobulin-like* » (72) qui interagissent avec la mucine présente sur la muqueuse gastro-intestinale. En conséquence, les bactériophages du microbiome intestinal, concentrés à la surface du mucus, se répliquent et tuent les bactéries qui se présentent. La lyse bactérienne limite la concentration locale des bactéries et protège les cellules épithéliales. Il en résulte un équilibre homéostatique à la surface du mucus. C'est un exemple de coévolution qui, tout en assurant au bactériophage sa réplication, fournit à l'hôte un mécanisme de défense de la muqueuse intestinale. Ce déterminisme pourrait-il être étendu à l'ensemble des interfaces du corps humain qui sont porteuses d'un microbiome ? Le contrôle de cette interaction phage-mucine-bactérie pourrait-il être utilisé pour améliorer la santé animale ou humaine ou comme stratégie de traitement des infections ? Cela reste encore à démontrer (73).

E) Bactériophages, antibiotiques et biofilms

Rappelons qu'en 2009, une étude faite *in vitro* avait montré qu'une culture planctonique de 24 heures d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* était plus sensible à l'amoxicilline en présence d'un bactériophage lytique (74). Les auteurs avaient conclu qu'une meilleure activité de l'antibiotique provenait de la destruction du biofilm. Une étude plus récente, déjà citée (63), a confirmé qu'il était possible d'éliminer des biofilms produits par une souche d'*E. coli* avec un bactériophage. L'augmentation des concentrations de céfotaxime (mais restant sublétales) a entraîné une augmentation du nombre de bactériophages répliqués (« *burst size* ») et réduit la période de latence. De plus, des combinaisons du bactériophage et du céfotaxime ont considérablement accru l'élimination des biofilms bactériens. Cette étude montre qu'une telle synergie entre bactériophages et antibiotiques conventionnels peut améliorer considérablement, du moins *in vitro*, le contrôle d'un biofilm. Toutefois, la production de bactériophages en présence d'un antibiotique est variable selon les molécules, comme cela a été montré sur une souche épidémique de *P. aeruginosa* isolée en Angleterre (75). Cette souche hébergeait six prophages. Parmi les antibiotiques testés (norfloxacine, ciprofloxacine, tobramycine, méropénème, azithromycine, colistine), seuls ceux appartenant à la famille des fluoroquinolones (norfloxacine et cipro-

floxacin) ont produit des bactériophages libres lytiques en quantité importante. On notera que le mode d'action de l'antibiotique est peut-être un facteur déterminant (interférence des fluoroquinolones avec la réplication de l'ADN bactérien).

F) Bactériophages et cellules eucaryotes

Très peu de travaux se sont appliqués à étudier les relations entre les cellules de l'organisme et les bactériophages. Ces virus, spécifiques des bactéries, sont réputés n'avoir aucun tropisme naturel pour les cellules eucaryotes et, de plus, il est admis qu'ils sont incapables de pénétrer dans les cellules des mammifères. L'absence de toute interférence entre le matériel génétique des bactériophages et des cellules eucaryotes serait donc une sécurité pour la phagothérapie.

De ce constat, il résulte l'incapacité des bactériophages à tuer les bactéries à développement intracellulaire et donc l'inadéquation de la phagothérapie à traiter certaines infections comme la tuberculose. Il est aussi admis qu'en raison de leur taille relativement importante par rapport aux antibiotiques, la plupart des bactériophages ne peuvent pas diffuser dans les tissus infectés. Ce dogme n'est pas en accord avec le fait qu'après administration même orale, des bactériophages ont été détectés dans la circulation générale, dans les tissus (foie et rate, par exemple) et qu'ils sont piégés par le tissu réticulo-endothélial. Cependant, il faut préciser que ces données ont été contredites par d'autres études selon les conditions et la méthodologie utilisées (animaux sains ou infectés, type de phage, etc.). En effet, chaque bactériophage peut avoir sa propre cinétique (24), ce qui explique en partie ces résultats opposés. Des travaux avaient montré dès 1940 que certains bactériophages pouvaient s'accumuler dans des tissus cancéreux et inhiber la croissance des tumeurs en s'attachant à la surface des cellules (76). Cet attachement s'effectuerait grâce à une protéine de structure située aux sommets (angles) de la capsid. *In vivo*, dans des modèles de souris traitées par des « phagebysats » d'*E. coli*, il a été constaté un retard d'apparition du cancer et un ralentissement de sa croissance pour, respectivement, 65 % et 80 % des animaux, et même une régression complète des tumeurs pour 13 % d'entre eux (77).

Si aujourd'hui les connaissances sur les interactions entre les bactériophages et les cellules eucaryotes sont encore insuffisantes, il a été avancé que l'utilisation de bactériophages ne compromettrait pas les activités bactéricides des phagocytes humains (78). Cette étude a également montré que les bactériophages T2 et T4 (spécifiques d'*E. coli*) et que le bactériophage A3 (spécifique de *S. aureus*) ne s'opposaient pas aux activités bactéricides des phagocytes humains (polynucléaires et monocytes). Cette absence d'action sur les phagocytes est indépendante du type de préparation phagique (purifiée ou non), et ceci, que les bactéries soient sensibles ou non aux bactériophages (homologues et hétérologues). Cette observation est un autre argument en faveur de la sécurité de la phagothérapie.

Très récemment, il a aussi été observé (79) que des bactériophages préalablement fixés à la surface d'une bactérie (*S. aureus*) sont phagocytés par des macrophages péritonéaux de souris, effectuent leur cycle lytique dans le macrophage, provoquent une réduction significative du nombre des bactéries intracellulaires et réduisent les dommages cytotoxiques qu'elles provoquent. Ainsi, le dogme selon lequel les bactériophages restent à l'extérieur des cellules n'est peut-être pas aussi strict et mérite un approfondissement. Cela a d'ailleurs été confirmé très récemment par une autre étude en utilisant des cellules dendritiques et une autre bactérie (*Cronobacter sakazakii*) (80).

L'étude de la pénétration intracellulaire des bactériophages devrait pouvoir bénéficier de techniques innovantes d'imagerie moléculaire comme le marquage de la capsid phagique en fluorescence, ce qui permettrait des analyses cinétiques sur cellules vivantes *in vitro* et au sein de tissus de mammifères vivants (captation et séquestration splénique) (81). Si la pénétration cellulaire est différente d'un bactériophage à l'autre, ce sera un point important à surveiller pour limiter au maximum la coexistence des génomes cellulaires procaryotes et eucaryotes au cours d'un traitement.

G) Bactériophages et immunité

Les bactériophages sont présents en abondance chez les mammifères et dans tous les cas, il se produit au moins un contact direct avec les cellules (82). Les bactériophages sont des structures complexes, caractérisées par une diversité antigénique importante et qui peuvent provoquer la production de plus d'un type d'anticorps anti-phages. Cette immunogénicité fut l'un des premiers outils pour la classification des bactériophages. Ultérieurement, les anticorps anti-phages ont été utilisés avec succès dans le diagnostic et la surveillance d'un certain nombre de déficits immunitaires, dont le SIDA. Ainsi les bactériophages peuvent induire des effets physiologiques d'ordre immunologique dans les organismes supérieurs, effets qui pourraient à leur tour influencer sur le résultat final de la phagothérapie (83). En effet, il a été avancé que les anticorps anti-phages joueraient un rôle dans l'élimination d'un bactériophage introduit dans un organisme et que la neutralisation des bactériophages par des anticorps spécifiques étaient un facteur limitant l'efficacité de la phagothérapie (84). Cependant, l'impact de ces anticorps sur l'efficacité des traitements, du moins pour certains bactériophages, semble relativement modéré (85), peut-être en rapport avec la capacité des bactériophages d'échapper à l'inactivation par une modification des motifs antigéniques de leur capsid.

Les effets des bactériophages sur la production des cytokines ont été peu étudiés et sont contradictoires. Cependant, des découvertes récentes suggèrent qu'*in vitro* (monocytes) comme *in vivo*, certains bactériophages (ou leurs protéines de capsid purifiées) n'augmentent pas ou même réduisent la sécrétion basale d'IL-6 et de TNF- α , comme ils peuvent aussi inhiber la production d'IL-2 et

d'IFN- γ (83). Ces rares données sont en accord avec le fait que l'administration de préparations de bactériophages ne provoque pas de réactions inflammatoires notables. Il est bien connu que des virus et des bactéries pathogènes de mammifères stimulent les phagocytes avec une induction excessive du **métabolisme oxydatif** qui peut exercer des effets néfastes sur les cellules. Avec les bactériophages, de rares et anciennes études ont indiqué que les phagocytes (polynucléaire et monocytes) ne semblaient pas être stimulés et que le métabolisme oxydatif était même diminué en leur présence, ce qui serait un argument supplémentaire en faveur d'une diminution des réactions défavorables lors d'une infection bactériennes, constituant un atout de plus pour la phagothérapie (86).

Ces données parfois divergentes doivent être examinées avec beaucoup de prudence. Il faut souligner que les

bactériophages ne sont pas seulement les entités les plus répandues dans le monde, mais aussi les plus différenciées. Les résultats obtenus avec un bactériophage peuvent être différents avec d'autres bactériophages ou d'autres types de cellules (80). De plus, les préparations « classiques » de bactériophages contiennent des « débris » libérés lors de la lyse bactérienne. Les techniques modernes permettent une purification plus poussée (pour autant qu'elle n'ait pas d'effet délétère sur les bactériophages) et il sera nécessaire de diversifier les méthodes (83). Quoiqu'il en soit, les quelques connaissances concernant les modifications de l'immunité innée ou acquise sous l'influence des bactériophages mériteraient d'être confirmées et, le cas échéant, précisées, ne serait-ce que concernant la problématique de la sécurité de la phagothérapie.

Seconde partie à suivre dans notre prochain numéro.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- (1) Dublanchet A, Patey O. Histoire de la phagothérapie. *Feuillets de Biologie* 2012 ; **53** : 59-65.
- (2) Dublanchet A, Patey O. La phagothérapie aujourd'hui. *Feuillets de Biologie* 2012 ; **54** : 41-55.
- (3) Appelbaum PC. 2012 and beyond: potential for the start of a second pre-antibiotic era? *J Antimicrob Chemother* 2012 ; **67** : 2062-8.
- (4) Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2011 ; **9** : 894-6.
- (5) Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013 ; **12** : 22. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/12/1/22>
- (6) Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo)* 2013 ; **66** : 571-91.
- (7) CDC. Control CfD, Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.
- (8) Bourlioux P. De quelles alternatives notre arsenal thérapeutique anti-infectieux dispose-t-il face aux bactéries multi-résistantes ? *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2013 ; **71** : 150-8.
- (9) Tillotson GS, Theriault N. New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. *F1000Prime Rep* 2013 ; **5** : 51. <http://www.ann-clinmicrob.com/content/12/1/22>
- (10) Centre d'Analyse Stratégique. Les bactéries résistantes aux antibiotiques, 2012.
- (11) Brussow H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* 2012 ; **434** : 138-42.
- (12) Gilmore BF. Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2012 ; **10** : 533-5.
- (13) Keen EC. Phage therapy: concept to cure. *Frontiers in Microbiology* 2012 ; **3** : 238.
- (14) Miedzzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawelczyk Z, Rogoz P, Kłak M, Wojtasik Eb, Gorski A. Clinical aspects of phage therapy. *Advances in Virus Research* 2012 ; **83** : 73-121.
- (15) Kropinski AM, Lingohr EJ, Moyles DM, Ackermann HW, Ojha S, Mazzocco A, She YM, Bach SJ, Rozema EA, Stanford K, McAllister TA, Johnson RP. Endemic bacteriophages: a cautionary tale for evaluation of bacteriophage therapy and other interventions for infection control in animals. *Viral J* 2012 ; **9** : 207-15.
- (16) Lloyd DH. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects. *Vet Dermatol* 2012 ; **23** : 299-304, e59-60.
- (17) Teitzel G. Harnessing the power of omics in microbiology. *Trends Microbiol* 2014 ; **22** : 227-8.
- (18) Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio* 2011 ; **2** : e00180-11.
- (19) Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 2012 ; **489** : 250-6.
- (20) Koskella B. Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host. *Curr Biol* 2013 ; **23** : 1256-60.
- (21) Koskella B, Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses* 2013 ; **5** : 806-23.
- (22) Bibby K. Improved bacteriophage genome data is necessary for integrating viral and bacterial ecology. *Microb Ecol* 2014 ; **67** : 242-4.
- (23) Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, Ehrlich D, Doré J. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 2013 ; **62** : 146-58.
- (24) Tsonos J, Vandenheuvel D, Briers Y, de Greve H, Hernalsteens JP, Lavigne R. Hurdles in bacteriophage therapy: deconstructing the parameters. *Vet Microbiol* 2014 ; **171** : 460-9.
- (25) Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front Microbiol* 2014 ; **5** : 51-doi: 10.3389/fmicb.2014.00051.
- (26) Storms ZJ, Brown T, Cooper DG, Sauvageau D, Leask RL. Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection. *FEMS Microbiol Lett* 2014 ; **353** : 63-8.
- (27) Betts A, Vasse M, Kaltz O, Hochberg ME. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Evol Appl* 2013 ; **6** : 1054-63.
- (28) Keen EC. Tradeoffs in bacteriophage life histories. *Bacteriophage* 2014 ; **4** : e28365.
- (29) Weitz JS, Poisot T, Meyer JR, Flores CO, Valverde S, Sullivan MB, Hochberg ME. Phage-bacteria infection networks. *Trends Microbiol* 2013 ; **21** : 82-91.
- (30) Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. The origin of the bacterial immune response. *Adv Exp Med Biol* 2012 ; **738** : 1-13.

- (31) Hoyland-Kroghsbo NM, Maerkedahl RB, Svenningsen SL. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio* 2013 ; 4 : e00362-12.
- (32) Hargreaves KR, Kropinski AM, Clokie MR. What does the talking?: quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. *PLoS One* 2014 ; 9 : e85131.
- (33) Refardt D, Bergmiller T, Kummerli R. Altruism can evolve when relatedness is low: evidence from bacteria committing suicide upon phage infection. *Proc Biol Sci* 2013 ; 280. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.3035>
- (34) Blower TR, Short FL, Fineran PC, Salmond GP. Viral molecular mimicry circumvents abortive infection and suppresses bacterial suicide to make hosts permissive for replication. *Bacteriophage* 2012 ; 2 : 234-8.
- (35) Blower TR, Evans TJ, Przybilski R, Fineran PC, Salmond GP. Viral evasion of a bacterial suicide system by RNA-based molecular mimicry enables infectious altruism. *PLoS Genet* 2012 ; 8 : e1003023.
- (36) Samson JE, Magadan AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* 2013 ; 11 : 675-87.
- (37) Bondy-Denomy J, Davidson AR. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR-Cas systems. *Trends Microbiol* 2014 ; 22 : 218-25.
- (38) Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 2013 ; 494 : 489-91.
- (39) De Paeppe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit MA. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Front Cell Infect Microbiol* 2014 ; 4 : 1-11.
- (40) Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jorgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clement K, Dore J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Meta HITc, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013 ; 500 : 541-6.
- (41) Sommer F, Backhed F. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013 ; 11 : 227-38.
- (42) Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 2013 ; 499 : 219-22.
- (43) Thormar H. Patented non-antibiotic agents as animal feed additives. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2012 ; 4 : 155-68.
- (44) Hannigan GD, Grice EA. Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013 ; 3 : a015362.
- (45) Pride DT, Salzman J, Haynes M, Rohwer F, Davis-Long C, White RA, 3rd, Loomer P, Armitage GC, Relman DA. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J* 2012 ; 6 : 915-26.
- (46) Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 2013 ; 1 : doi:10.1186/2049-2618-1-12.
- (47) Letarov AV. Bacteriophages as part of the human microbiome, in *Bacteriophages in Health and Disease*, P. Hyman and S.T. Abedon, Editors. 2012: Wallingford, Oxfordshire, UK. 6-20.
- (48) Berger G, Wunderink RG. Lung microbiota: genuine or artifact? *Isr Med Assoc J* 2013 ; 15 : 731-3.
- (49) Liu B, Shadrin A, Sheppard C, Mekler V, Xu Y, Severinov K, Matthews S, Wigneshweraraj S. The sabotage of the bacterial transcription machinery by a small bacteriophage protein. *Bacteriophage* 2014 ; 4 : e28520.
- (50) Liu B, Shadrin A, Sheppard C, Mekler V, Xu Y, Severinov K, Matthews S, Wigneshweraraj S. A bacteriophage transcription regulator inhibits bacterial transcription initiation by sigma-factor displacement. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 4294-305.
- (51) Yosef I, Kiro R, Molshanski-Mor S, Edgar R, Qimron U. Different approaches for using bacteriophages against antibiotic-resistant bacteria. *Bacteriophage* 2014 ; 4 : e28491.
- (52) Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol* 2012 ; 7 : 1147-71.
- (53) Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 2014 ; 52 : 243-58.
- (54) Joao Catalao M, Gil F, Moniz-Pereira J, Sao-Jose C, Pimentel M. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol Rev* 2013 ; 37 : 554-71.
- (55) Kiro R, Molshanski-Mor S, Yosef I, Milam SL, Erickson HP, Qimron U. Gene product 0.4 increases bacteriophage T7 competitiveness by inhibiting host cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : 19549-54.
- (56) Biddappa AC, Sundararajan S, Ramalinga AB, Sriram B, Padmanabhan S. *Staphylococcus* bacteriophage tails with bactericidal properties: new findings. *Biotechnol Appl Biochem* 2012 ; 59 : 495-502.
- (57) Beckett EM. The characterization of staphylococcal phage tails as an alternative to chemical antibiotics, 2012, University of Toronto.
- (58) Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology* 2010 ; 28 : 591-5.
- (59) Kirby AE. Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 2012 ; 7 : e51017.
- (60) Chhibber S, Kaur T, Sandeep K. Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One* 2013 ; 8 : e56022.
- (61) Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage mediated killing of *Staphylococcus aureus* *in vitro* on orthopaedic K wires in presence of linezolid prevents implant colonization. *PLoS One* 2014 ; 9 : e90411.
- (62) Knezevic P, Curcin S, Aleksic V, Petrusic M, Vlaski L. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combating *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology* 2013 ; 164 : 55-60.
- (63) Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012 ; 65 : 395-8.
- (64) Wolska KI, Grzes K, Kurek A. Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Pol J Microbiol* 2012 ; 61 : 95-104.
- (65) Murray JL, Connell JL, Stacy A, Turner KH, Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J Microbiol* 2014 ; 52 : 188-99.
- (66) Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Appl Environ Microbiol* 2012 ; 78 : 8227-33.
- (67) Edgar R, Friedman N, Molshanski-Mor S, Qimron U. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Appl Environ Microbiol* 2012 ; 78 : 744-51.
- (68) Jalasvuori M, Friman VP, Nieminen A, Bamford JK, Buckling A. Bacteriophage selection against a plasmid-encoded sex apparatus leads to the loss of antibiotic-resistance plasmids. *Biol Lett* 2011 ; 7 : 902-5.
- (69) Ojala V, Laitalainen J, Jalasvuori M. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. *Evol Appl* 2013 ; 6 : 925-32.
- (70) Lungren MP, Christensen D, Kankotia R, Falk I, Paxton BE, Kim CY. Bacteriophage K for reduction of biofilm on central venous catheter material. *Bacteriophage* 2013 ; 3 : e26825.
- (71) Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, Rohwer F. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : 10771-6.
- (72) Barr JJ, Youle M, Rohwer F. Innate and acquired bacteriophage-mediated immunity. *Bacteriophage* 2013 ; 3 : e25857.
- (73) Anonymous. Bacteriophage-protectors at mucosal surfaces. *Clin Infect Dis* 2013 ; 57 : iv.
- (74) Bedi M, Verma V, Chhibber S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009 ; 25 : 1145-51.
- (75) Fothergill JL, Mowat E, Walshaw MJ, Ledson MJ, James CE, Winstanley C. Effect of antibiotic treatment on bacteriophage production by a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011 ; 55 : 426-8.
- (76) Dabrowska K, Skaradzinski G, Kurzepa A, Owczarek B, Zaczek M, Weber-Dabrowska B, Wietrzyk J, Maciejewska M, Budynek P, Gorski A. The effects of staphylococcal bacteriophage lysates on cancer cells *in vitro*. *Clin Exp Med* 2010 ; 10 : 81-5.

- (77) Gambashidze K, Khorava P, Azaladze T, Kalandarishvili K, Jaiani E, Lasareishvili BA, Azaladze A, Tediashvili MA. Antitumor and adjuvant effects of phage lysates of *E. coli* in mice with Ehrlich carcinoma. *Exp Oncol* 2012 ; **34** : 107-11.
- (78) Kurzepa-Skaradzinska A, Lusiak-Szelachowska M, Skaradzinski G, Jonczyk-Matysiak E, Weber-Dabrowska B, Zaczek M, Maj T, Slawek A, Rymowicz W, Klak M, Miedzybrodzki R, Gorski A. Influence of bacteriophage preparations on intracellular killing of bacteria by human phagocytes *in vitro*. *Viral Immunol* 2013 ; **26** : 150-62.
- (79) Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014 ; **98** : 4653-61.
- (80) An TW, Kim SJ, Lee YD, Park JH, Chang HI. The immune-enhancing effect of the *Cronobacter sakazakii* ES2 phage results in the activation of nuclear factor-kappaB and dendritic cell maturation via the activation of IL-12p40 in the mouse bone marrow. *Immunol Lett* 2014 ; **157** : 1-8.
- (81) Kazmierczak Z, Piotrowicz A, Owczarek B, Hodyra K, Miernikiewicz P, Lecion D, Harhala M, Gorski A, Dabrowska K. Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. *Bacteriophage* 2014 ; **4** : e28364.
- (82) Duerkop BA, Hooper LV. Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat Immunol* 2013 ; **14** : 654-9.
- (83) Dabrowska K, Miedzybrodzki R, Miernikiewicz P, Figura G, Klak M, Gorski A. Non-bactericidal effects of phages in mammals, in Phage therapy: current research and applications, J. Borysowski, R. Miedzybrodzki, and A. Gorski, Editors. 2014: Norfolk (England). 141-55.
- (84) Gorski A. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res* 2012 ; **83** : 41-71.
- (85) Lusiak-Szelachowska M, Zaczek M, Weber-Dabrowska B, Miedzybrodzki R, Klak M, Fortuna W, Letkiewicz S, Rogoz P, Szufnarowski K, Jonczyk-Matysiak E, Owczarek B, Gorski A. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunol* 2014 ; **27** : 295-304.
- (86) Miernikiewicz P, Dabrowska K, Piotrowicz A, Owczarek B, Wojas-Turek J, Kicielinska J, Rossowska J, Pajtasz-Piasecka E, Hodyra K, Macegoniuk K, Rzewucka K, Kopciuch A, Majka T, Letarov A, Kulikov E, Maciejewski H, Gorski A. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 2013 ; **8** : e71036.