

41^e

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 13 & MARDI 14
DÉCEMBRE 2021

Palais des Congrès
Paris

www.ricai.fr



R I C A I

BACTÉRIOPHAGES : LES TROUVER, LES PRODUIRE, LES PURIFIER

Dr. Camille Kolenda

Assistante Hospitalo-Universitaire

Institut des Agents Infectieux, Hospices Civils de Lyon

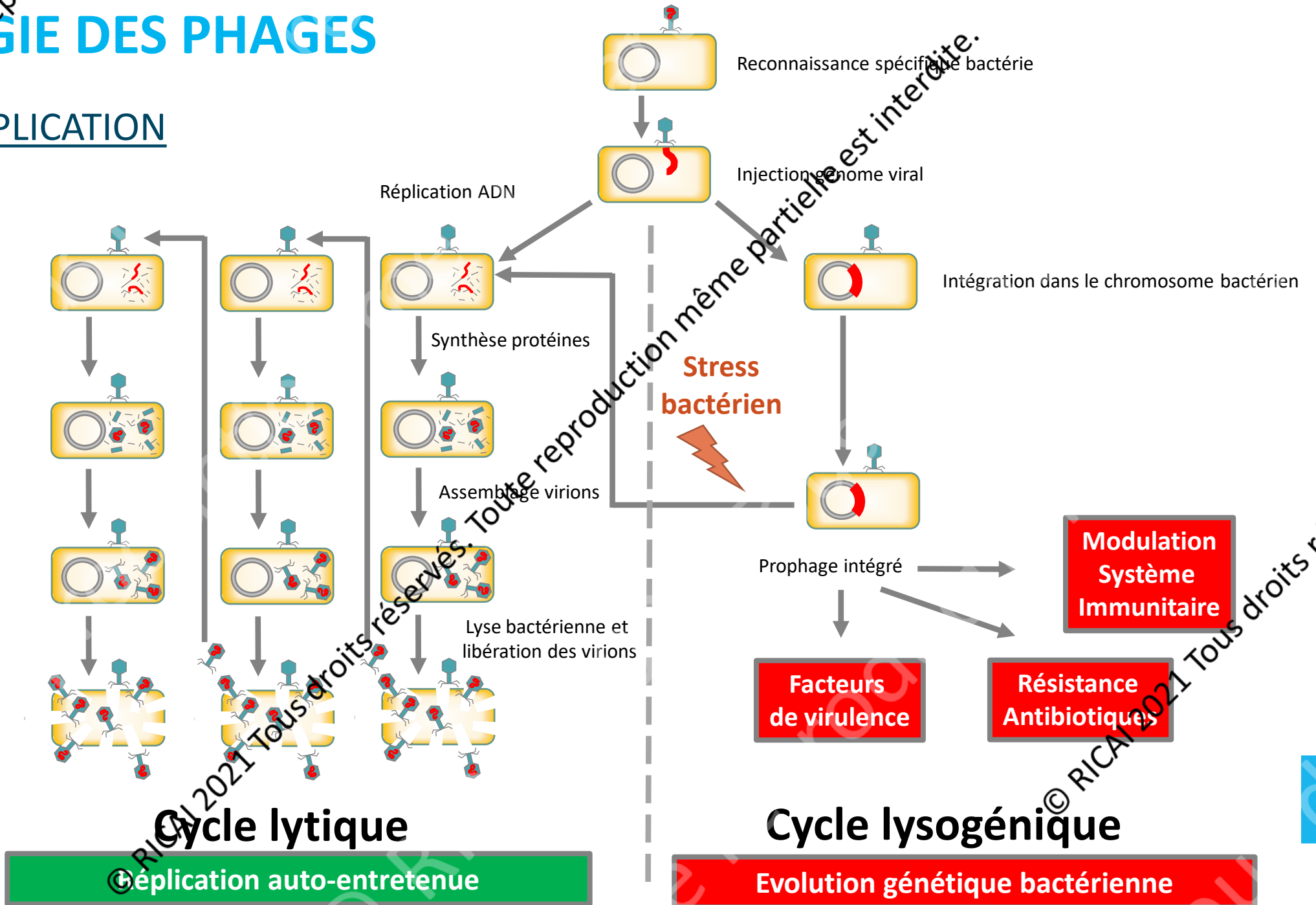


PHAGEinLYON



LA BIOLOGIE DES PHAGES

CYCLES DE RÉPLICATION

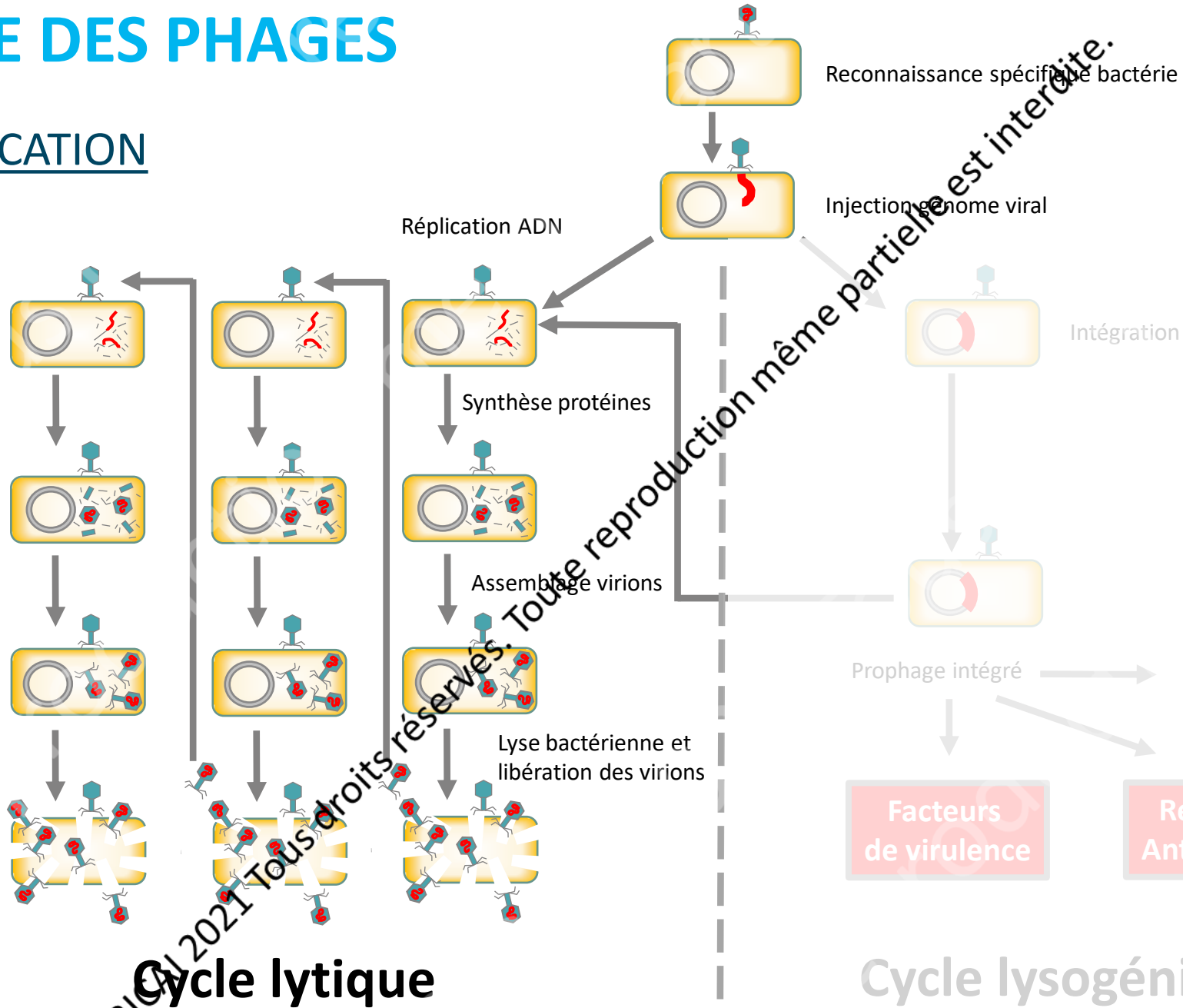


LA BIOLOGIE DES PHAGES

CYCLES DE RÉPLICATION

Phagothérapie :

Utilisation de phages strictement lytiques



Cycle lytique

Représentation visuelle de la **Réplication auto-entretenu** (cycle lytique)

Cycle lysogénique

Représentation visuelle de l'**Evolution génétique bactérienne** (cycle lysogénique)

HISTORIQUE DE LA PHAGOTHÉRAPIE



1917 : Découverte par F. d'Hérelle (Patients atteints de dysenterie)



Post 2nde guerre mondiale : développement des antibiotiques
Abandon de la phagothérapie par les pays occidentaux



Production et utilisation des bactériophages dans les pays de l'**ex-URSS** (Institut Eliava, Géorgie)



XXI^{ème} siècle : **Emergence des résistances bactériennes**
Regain d'intérêt mondial pour la phagothérapie

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

OFFRES THÉRAPEUTIQUES DE PHAGES

APPROCHE HISTORIQUE

Utilisation « probabiliste »
de cocktails polyvalents de phages



Géorgie



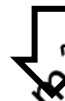
Russie

Utilisation large

- ✓ Pas de validation clinique
- ✓ Conditions de production

MÉDECINE PERSONNALISÉE

Adaptation au phagogramme



Production privée



États-Unis



France

Quelques phages
anti-*S. aureus* ou *P. aeruginosa*

- ✓ Traitements compassionnels
- ✓ Essais cliniques en cours

Production académique



États-Unis



Belgique

Larges collections
de phages

© BICAI 2021 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

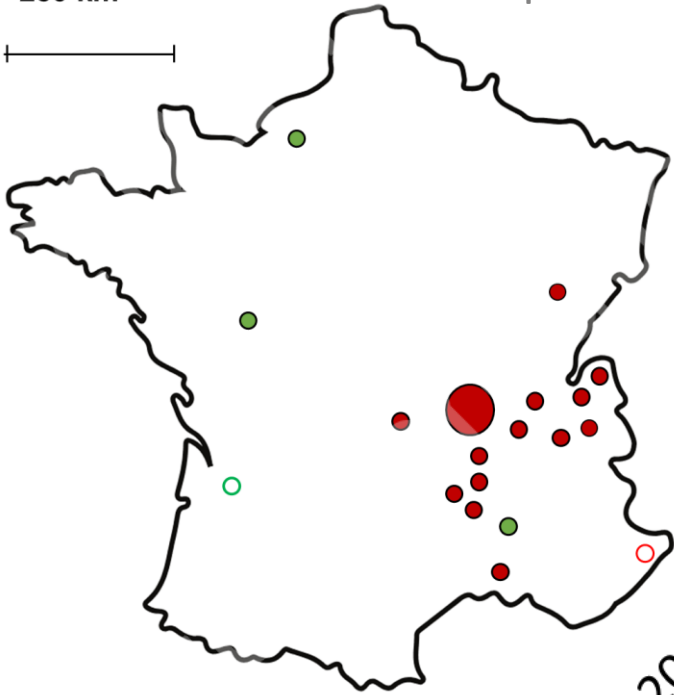
DÉVELOPPEMENT DE LA PHAGOTHÉRAPIE EN FRANCE

EXPERIENCE DES HCL

2017-2021 : Traitements compassionnels

30 patients traités (IOA complexes ++)
sous supervision de l'ANSM

250 km

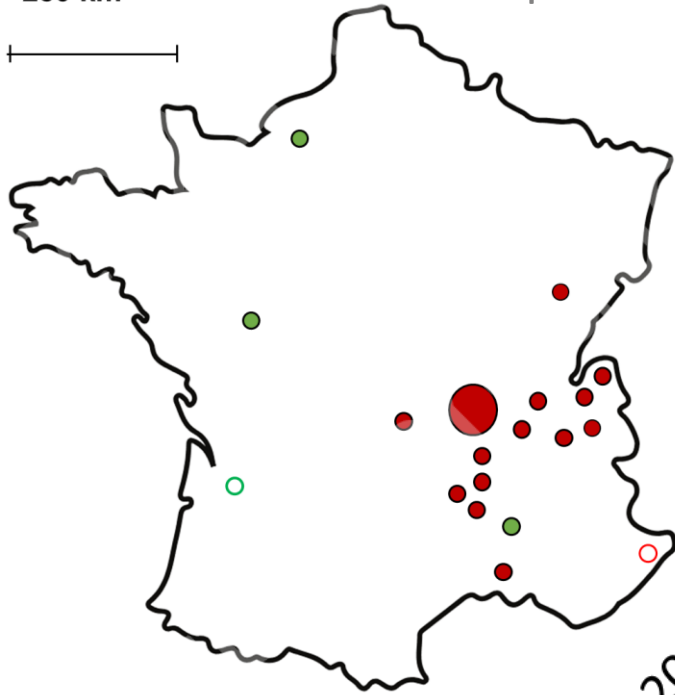


EXPERIENCE DES HCL

2017-2021 : Traitements compassionnels

30 patients traités (IOA complexes ++)
sous supervision de l'ANSM

250 km



Limites actuelles

- × Offre limitée de phages
(espèces non ciblées/souches résistantes aux phages disponibles)
 - × Délai de phagogramme/délivrance
 - × Coût ?
 - × Statut ?
- Pérénnité du modèle privé exclusif actuel
pour les médicaments?

DÉVELOPPEMENT DE LA PHAGOTHÉRAPIE EN FRANCE

8

PERSPECTIVES ?

Avis Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM), CSST juin 2019 Phagothérapie

« L'ensemble des enjeux soulevés par la phagothérapie conduit à plaider en faveur de la mise en place d'une **plateforme nationale d'orientation et de validation du recours aux phages** et qui pourrait à terme **travailler à la mise en œuvre d'une production académique en France de phages pour usage clinique à partir d'une phagothèque** »

© RICAI 2021. Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

CRÉATION D'UNE PLATEFORME ACADÉMIQUE DE PHAGOTHÉRAPIE



Programme
PHAGEin**LYON**

HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON

FONDATION
HCL
HOSPICES CIVILS
DE LYON



X milliards phages naturels

>10¹⁰ PFU/mL phages purifiés

© RICAI 2021 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2021 Tous droits réservés.

CRÉATION D'UNE PLATEFORME ACADÉMIQUE DE PHAGOTHÉRAPIE



Programme
PHAGEin**LYON**



X milliards phages naturels

>10¹⁰ PFU/mL phages purifiés

PHAG-ONE

➡ **Isolement/caractérisation, production et purification** de phages actifs contre différents pathogènes selon les attentes de l'ANSM pour l'administration chez l'homme

DÉVELOPPEMENT D'UNE PRODUCTION ACADÉMIQUE DE PHAGES

ÉTAPEX PRINCIPAUX

Isoler

- Large collection de phages actifs sur des espèces différentes/panels de souches représentatifs de l'épidémiologie
- Phages strictement lytiques

Produire

- Sélection de la souche de production/sécurité du patient
- Optimisation des rendements

Purifier

- Elimination contaminants bactériens
- Contrôles qualité

ISOLER ET CARACTÉRISER

Réservoirs naturels

- **Prélèvements environnementaux**

- ✓ Eaux usées ++
- ✓ Stratégie largement utilisée

- **Prélèvements cliniques**

- ✓ Plus laborieux !
Pacifico *et al.* Frontiers 2016
Phages anti-*E. coli* dans 65/111 échantillons
(hémocultures, urines, aspirations trachéales ++)
- ✓ Recherche de phages pour un patient donné
à partir de ces prélèvements cliniques ?

STRATÉGIES

Réservoirs naturels

- **Prélèvements environnementaux**

- ✓ Eaux usées ++
- ✓ Stratégie largement utilisée

- **Prélèvements cliniques**

- ✓ Plus laborieux !
Pacifico *et al.* Frontiers 2011
Phages anti-*E. coli* dans 66/111 échantillons
(hémocultures, urines, aspirations trachéales ++)
- ✓ Recherche de phages pour un patient donné à partir de ces prélèvements cliniques ?

Définir la cible bactérienne

- **Spécificité importante** des phages à une espèce/groupe de souches au sein d'une espèce
- Etablir **collection de souches représentatives de l'épidémiologie** de l'espèce cible

« PHAGE FISHING »

Echantillon
environnement



0,2 µm
filtration



5 mL

10x medium

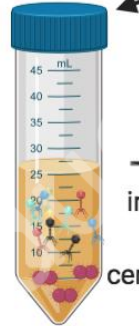


Culture de bactéries
phase stationnaire



10 µL

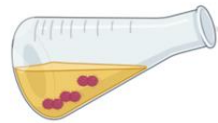
Contact



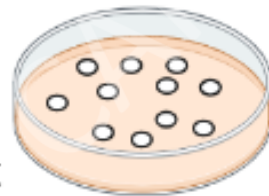
incubation
et
centrifugation



0,2 µm
filtration



incubation



© RICAI 2021 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

« PHAGE FISHING »

Echantillon
environnement



0,2 µm
filtration

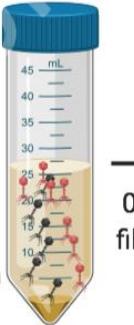


5 mL



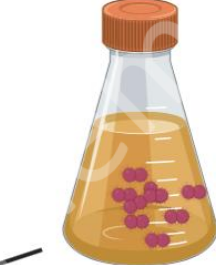
Contact

incubation
et
centrifugation

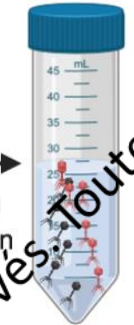


Culture de bactéries
phase stationnaire

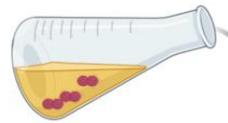
10x medium



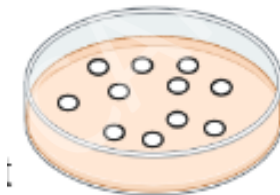
10 µL



0,2 µm
filtration



incubation



ISOLEMENT

Remise en
solution



X 5

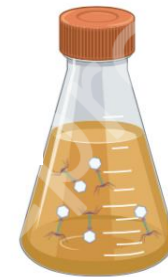
incubation



Séquençage

Exclusion phages
lysogéniques

0,2 µm
filtration



Phage pur

Activité

© RICAI 2021 Tous droits réservés

© RICAI 2021 Tous droits réservés

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

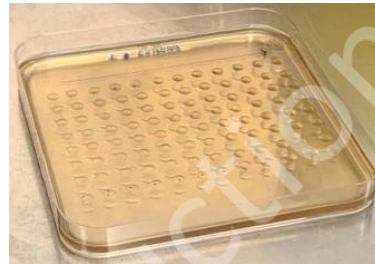
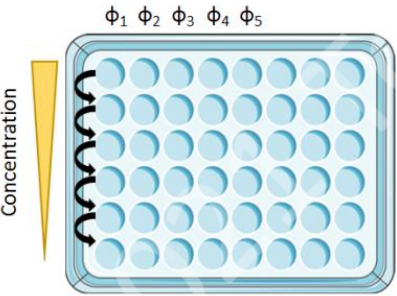
CARACTÉRISATION DU SPECTRE D'ACTIVITÉ DES PHAGES

1. Efficiency of Plating (EOP)

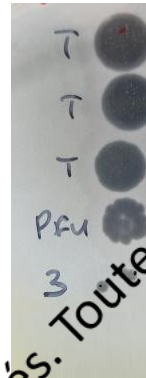
Dilution phages

Spot test

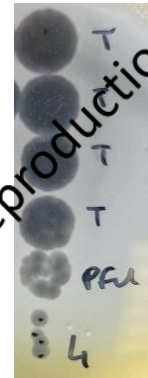
Détermination titre
(PFU = Plaque Forming Unit)



Dépôt phages sur
gélose avec bactéries



Souche
test



Souche
référence

10⁻¹
10⁻²
10⁻³
10⁻⁴
10⁻⁵
10⁻⁶

$$EOP = \frac{\text{Titre souche test}}{\text{Titre souche ref}}$$

Forte efficacité : EOP > 0,1

Efficacité intermédiaire : 0,001 < EOP < 0,1

Mirzai PlosOne 2015, Green Scientific Reports 2016



Lyse partielle/externe

Pas de PFU, EOP = 0



✓ **Technique de screening**

✗ **Opérateur dépendant (visibilité PFU)**

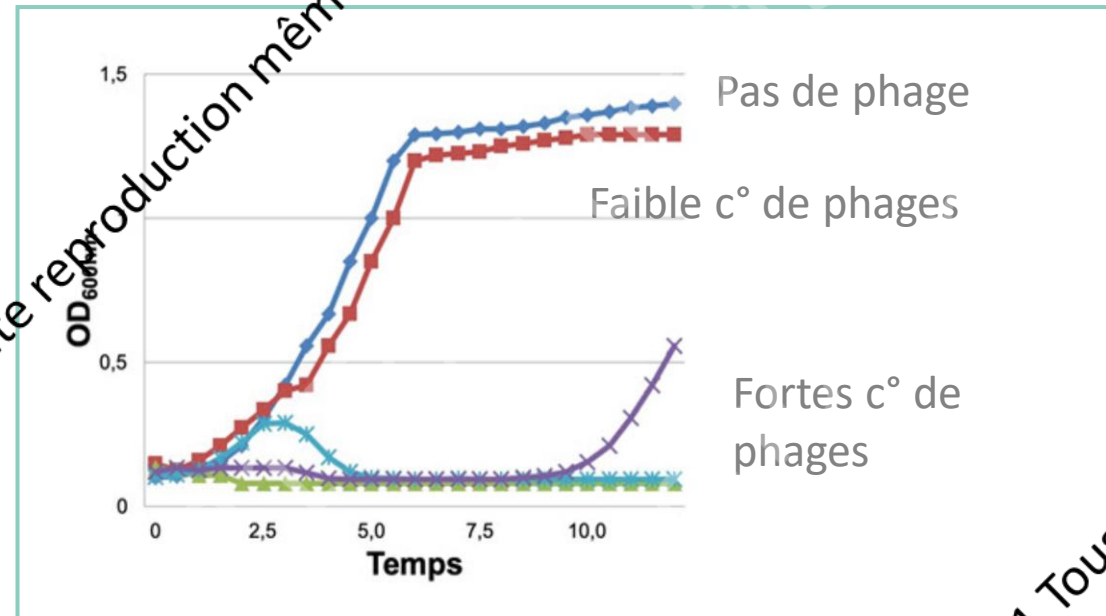
© RICAI 2021 Tous droits réservés

CARACTÉRISATION DU SPECTRE D'ACTIVITÉ DES PHAGES

2. Inhibition croissance bactérienne en milieu liquide



Spectrophotométrie



✓ **Automatisable**

✗ **Pas de critères standardisés d'interprétation des profils d'inhibition entre laboratoires**

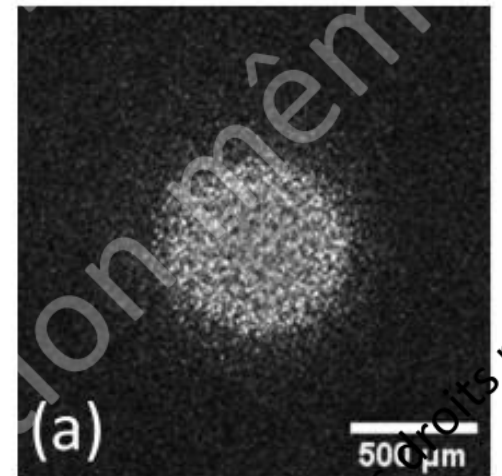
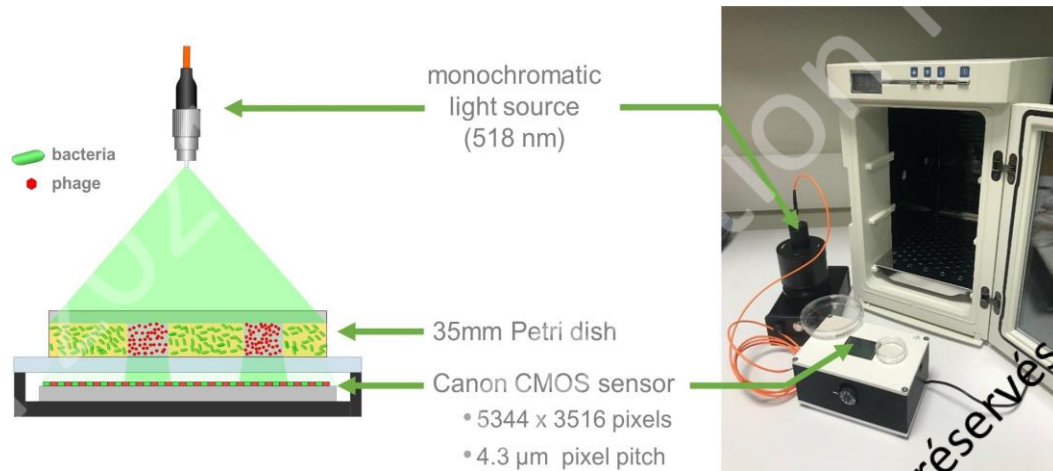
MODERNISATION DES TECHNIQUES



CEA Grenoble (LETI) : Détection et dénombrement précoce de PFU

Imagerie sans lentille

Numérisation du signal



Résolution : 4,3 μm

© RICAI 2021 Tous droits réservés.

© RICAI 2021 Tous droits réservés.



MODERNISATION DES TECHNIQUES

Vesale Bioscience : Mesure de la consommation d'ATP



Détermination rapide et automatisée de l'activité des phages

3. Le software

Composition personnalisée d'un assemblage de phage en fonction de la sensibilité de la souche patient



2. Le luminomètre

Détection haute sensibilité de la consommation d'ATP par bioluminescence



1. Le kit

Plus de 90 phages évalués par test

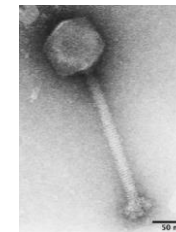
© RICAI 2021 Tous droits réservés



COLLECTION DE PHAGES ANTI-STAPHYLOCOCCUS

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE

17 phages *Twortvirinae* : 14/17 *Kayvirus*, 3/17 *Silviavirus*



Ordre	Caudovirales																
Famille	Herelleviridae																
Sous famille	Twortvirinae																
Genre	<i>Kayvirus</i> (140,244 - 142,728 pb)													<i>Silviavirus</i> (133,541 - 138,388 pb)			
	V1SA1	V1SA5	V1SA6	V1SA7	V1SA8	V1SA9	V1SA10	V1SA11	V1SA12	V1SA13	V1SA14	V1SA15	V1SA16	V1SA18	V1SA19	V1SA20	V1SA22
V1SA1		87/99,9	97/99,5	93/98,1	90/93,9	94/98,1	90/95,9	93/95,3	94/98,1	88/93,0	97/99,9	84/96,8	88/94,2	96/99,9	20/80,5	18/79,1	21/79,1
V1SA5			88/98,5	85/98,2	84/94,4	85/98,9	84/96,0	86/95,8	84/97,8	83/93,2	88/99,9	82/98,2	84/94,2	86/99,8	20/80,5	18/79,1	21/79,1
V1SA6				94/97,9	90/93,8	94/98,6	90/95,1	93/97,0	93/97,9	87/93,2	98/98,7	83/95,8	88/94,2	95/99,6	21/80,5	18/79,1	21/79,1
V1SA7					91/94,5	91/97,5	93/98,0	93/94,0	93/96,5	91/93,1	93/98,2	84/99,3	88/94,1	91/97,9	25/80,5	23/78,9	24/78,9
V1SA8						89/93,7	90/96,3	94/98,2	92/94,8	92/97,4	90/93,5	83/94,8	92/97,8	90/93,7	24/80,4	24/79,8	24/79,0
V1SA9							89/97,5	92/96,9	93/97,6	88/93,2	95/98,9	84/97,2	88/96,4	97/98,9	20/80,6	18/79,2	22/79,2
V1SA10								94/96,3	94/96,2	92/96,8	92/95,8	85/99,2	89/95,3	91/95,8	22/80,6	22/78,8	24/78,8
V1SA11									97/97,0	91/96,0	93/95,7	82/96,0	90/97,4	91/96,0	22/80,5	19/79,1	19/79,1
V1SA12										91/94,6	95/97,7	83/97,4	89/94,5	93/98,3	20/80,4	18/79,1	21/79,1
V1SA13											89/93,2	84/94,7	89/97,7	89/93,2	22/80,1	20/79,3	19/80,7
V1SA14												83/98,2	88/94,2	86/99,9	20/80,5	18/79,1	21/79,1
V1SA15													81/95,1	83/96,8	23/80,6	24/79,1	27/79,1
V1SA16														89/94,2	25/80,9	24/79,5	24/78,0
V1SA18															21/80,5	18/79,1	22/79,1
V1SA19																86/97,2	88/97,0
V1SA20																	96/99,1
V1SA22																	

% couverture/identité (blastn)

© RICA 2021

COLLECTION DE PHAGES ANTI-STAPHYLOCOCCUS

CARACTÉRISATION DU SPECTRE D'ACTIVITÉ

Panel de souches représentatives des principaux clones MSSA/MRSA (n=30)

%	<i>Kayvirus</i>												<i>Silviavirus</i>				
	V1SA1	V1SA5	V1SA6	V1SA7	V1SA8	V1SA9	V1SA10	V1SA11	V1SA12	V1SA13	V1SA14	V1SA15	V1SA16	V1SA18	V1SA19	V1SA20	V1SA22
MSSA	82	41	76	82	71	76	71	76	88	18	76	12	47	65	82	94	82
MRSA	38	15	23	46	54	46	46	38	38	0	31	15	15	38	54	85	62
Total	63	30	53	67	63	63	60	60	67	10	57	13	33	53	70	90	73

Pourcentages de souches avec EQA $\geq 0,001$

✓ Activité *Silviavirus* > *Kayvirus*
 Activité sur SASM > SARM

© RICAI 2021 Tous droits réservés



CARACTÉRISATION DU SPECTRE D'ACTIVITÉ

Évaluation de la spécificité envers les principales espèces de staphylocoques à coagulase négative (n=66)

	<i>Kayvirus</i>	<i>Silviavirus</i>
<i>S. epidermidis</i>	0-3	0
<i>S. capitis</i>	90-100	0
<i>S. caprae</i>	20-60	0
<i>S. haemolyticus</i>	0-33	0
<i>S. lugdunensis</i>	30-80	0
Total	21-44	0

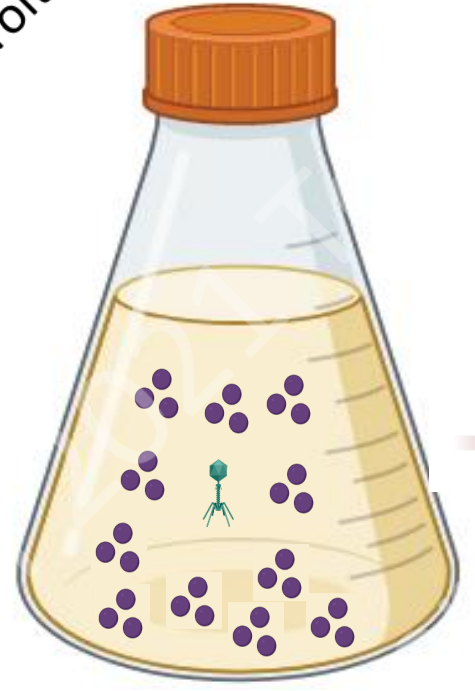
pourcentages de souches avec EOP $\geq 0,001$

- ✓ *Kayvirus* activité polyvalente
- ✓ Activité espèce dépendante

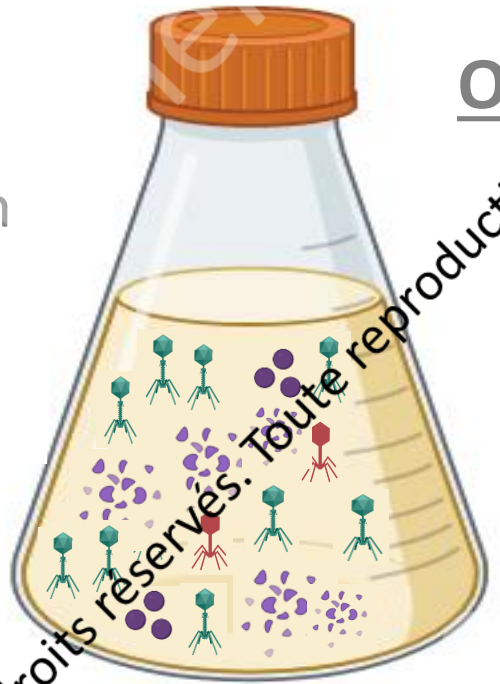
PRODUIRE



PRODUCTION DE PHAGES THÉRAPEUTIQUES

EN JEUX




Amplification phages



-  Souche de production
-  Phage thérapeutique

 Métabolites bactériens

 Phage lysogénique contaminant provenant de la souche de production

Objectif 1 : Safety (maîtrise de risques)

Contrôler et maîtriser la production de contaminants bactériens

Objectif 2 : Rendements (> 10¹⁰ PFU/mL)

Production pharmaceutique

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2021

SÉLECTION SOUCHE DE PRODUCTION

“OPTIMALE” POUR UTILISATION THÉRAPEUTIQUE FUTURE

- ✓ Absence de **mécanismes majeurs de résistance aux antibiotiques** (ex: gène *mecA* pour *Staphylococcus* spp.)
- ✓ Faible nombre et/ou concentration de **toxines produites** (risque théorique de choc toxique, superantigènes actifs à très faible concentration)
- ✓ Absence ou nombre minimal de **prophages** (potentiel effet immunosuppresseur ou modulateur de virulence si insertion ?)

(Sweere Science 2019, Laumay Frontiers 2020)

→ Sélection de souches bactériennes candidates sur la base de l'analyse de leurs génomes (WGS)

SÉLECTION SOUCHE DE PRODUCTION



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



CNR Staph

S. aureus

≈ 3000 souches séquencées

Antibiogramme

SASM

Virulence

Pas de production de toxines « accessoire »

Prophage

Pas de prophage dans le génome

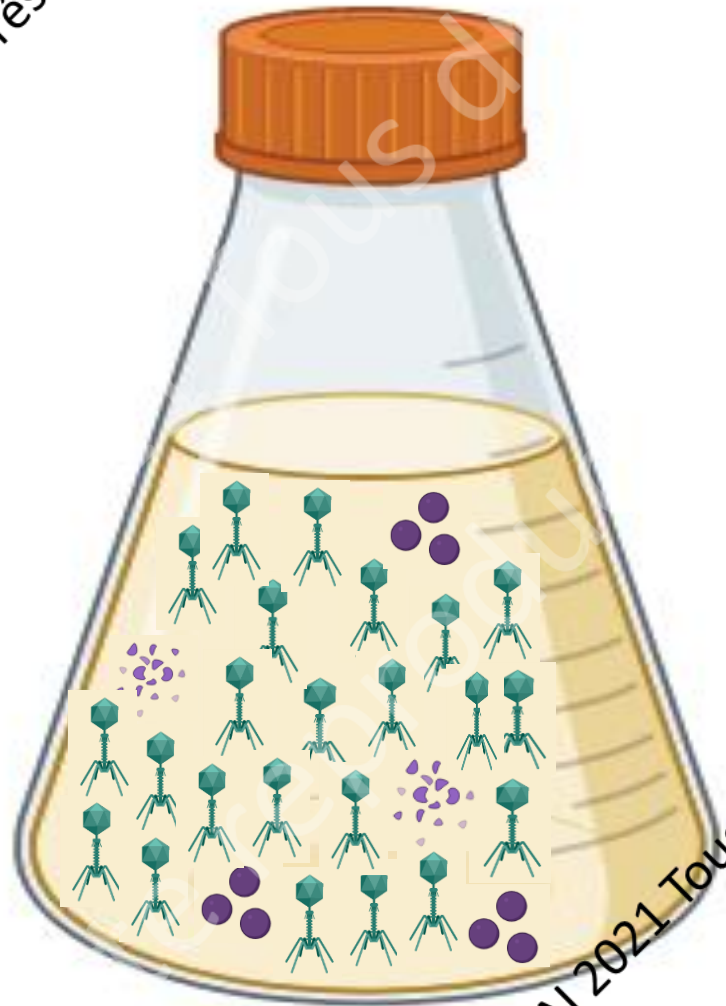
Production

Rendement

8 souches de 4 *sequence type*

© RICAI 2021 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

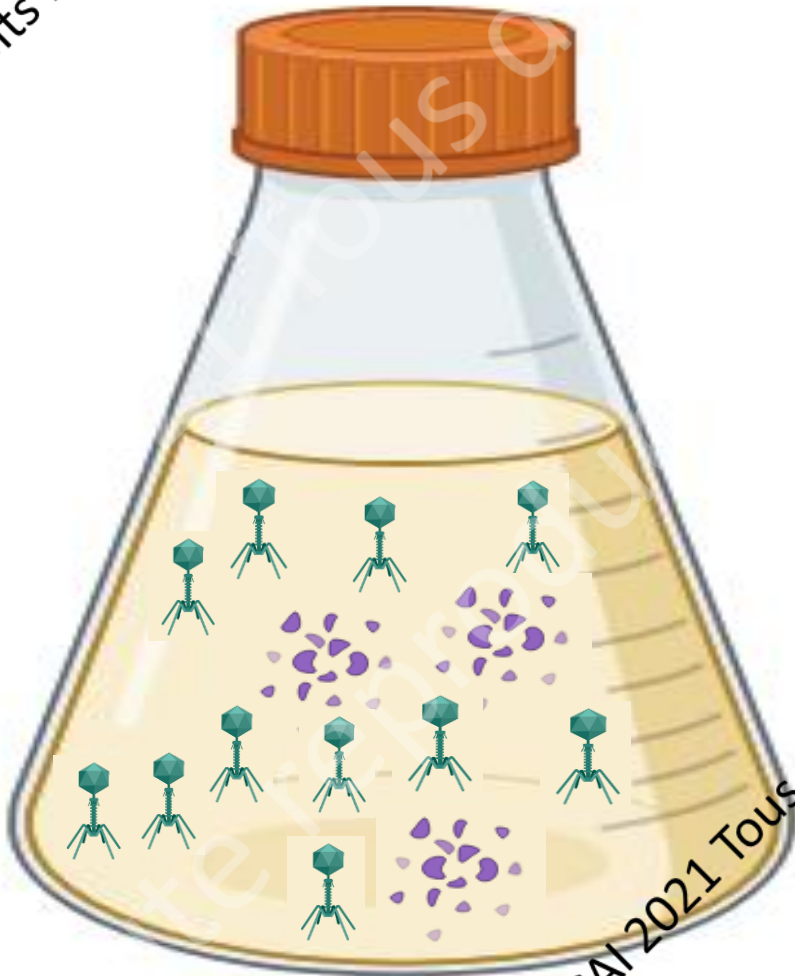
OPTIMISATION PRODUCTION



- Phase de croissance bactérienne
- Multiplicity of infection (MOI)
- Milieu de production

PURIFIER

ENJEUX



A. Filtration stérilisante

Élimination des bactéries vivantes résiduelles et débris bactériens

B. Purification

- ✓ Élimination des métabolites/ facteurs de virulence sécrétés (endotoxines, ADN bactérien etc.)
- ✓ Tampon de conservation

C. Libération pharmaceutique : Contrôles Qualité

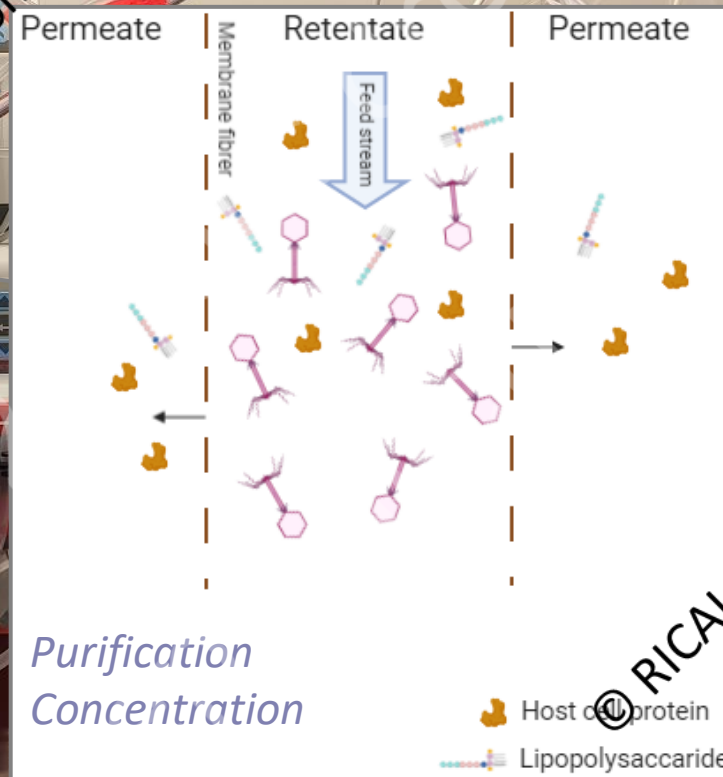
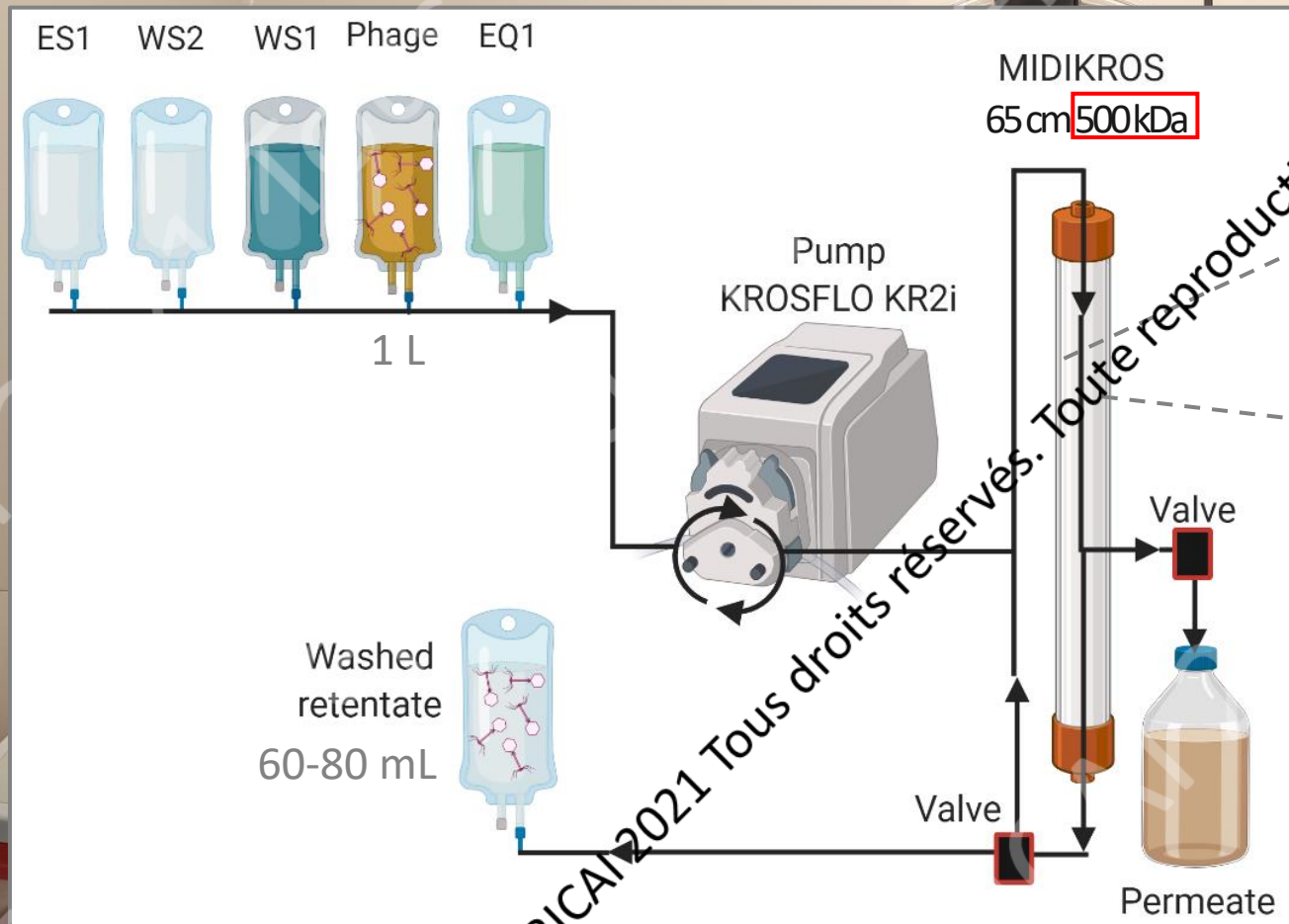
- ✓ Identité phage
- ✓ Efficacité de la purification



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2021 Tous droits réservés.

FILTRATION TANGENTIELLE



HCL

HOSPICES CIVILS
DE LYON



Lyon 1

PLATEFORME HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

FRIPHARM®

FABRICATION, RECHERCHE ET INNOVATION PHARMACEUTIQUES

Pr Fabrice PIROT

www.chu-lyon.fr/fr/FRIPHARM

PURIFICATION DES PHAGES

ZONE DE PRODUCTION BPF D'UNE PHARMACIE HOSPITALIÈRE

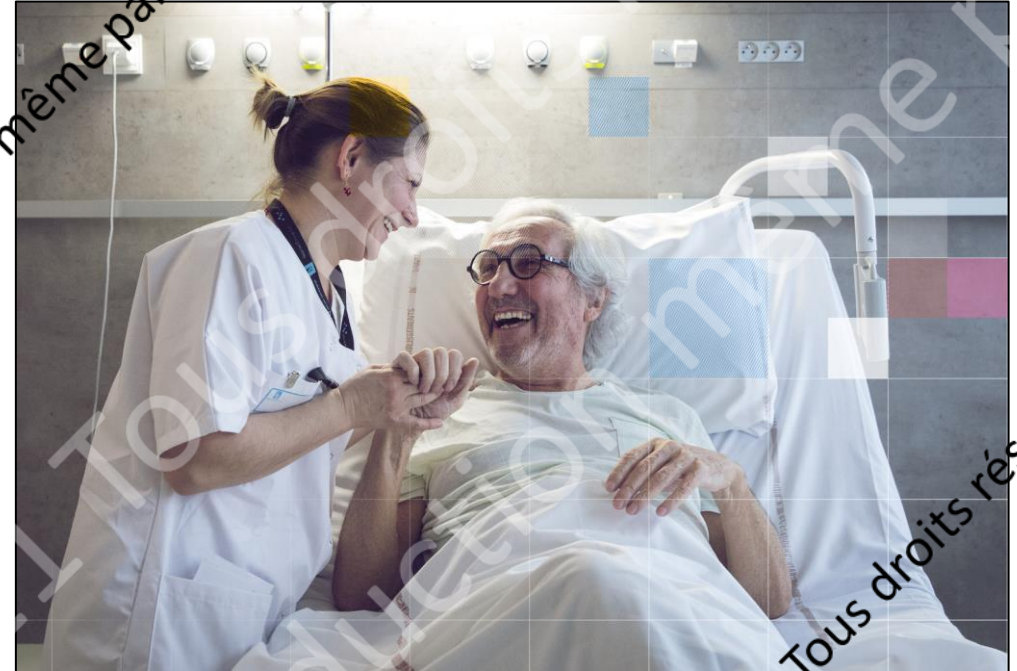


FRIPHARM (HCL-UCBL) :

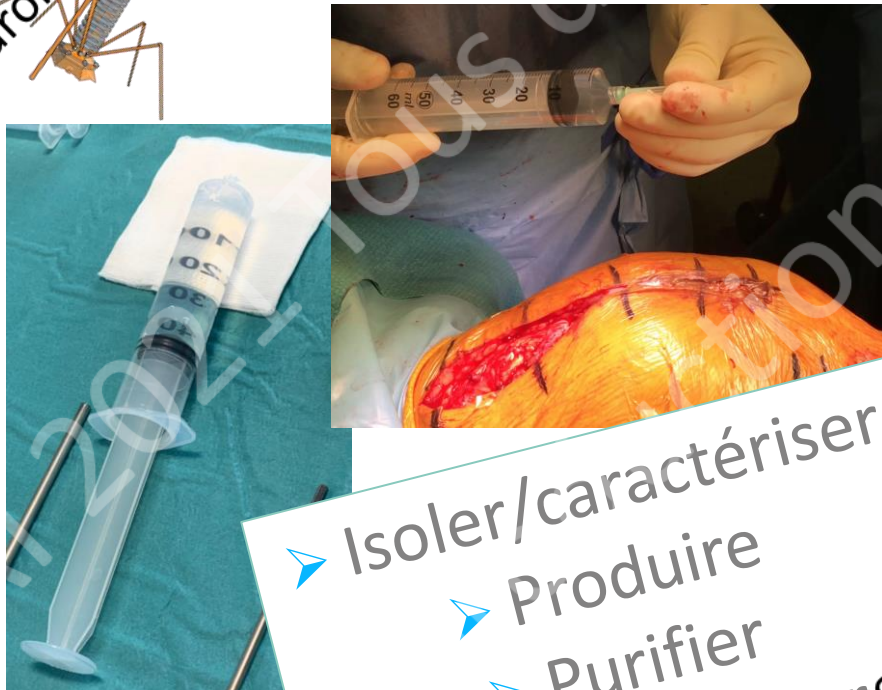
Fabrication Research Innovation for Pharmaceuticals (2017)

Qualification selon la Pharmacopée Européenne:

- ✓ Essai de stérilité
- ✓ Essai des endotoxines bactériennes (LAL)
- ✓ Protéines totales (Bradford)
- ✓ ADN résiduel de la cellule hôte et du vecteur (qPCR)
- ✓ Activité Hémolytique (spectrophotométrie)
- ✓ Recherche des résidus de purification (HPLC-UV ou HPLC-MS)



DÉVELOPPEMENT D'UNE PRODUCTION ACADÉMIQUE DE PHAGES



- Isoler/caractériser
- Produire
- Purifier
- Conditionner

>10¹⁰ PFU/mL
d'un seul phage par

Un seul type de phage (pouche)

- ✓ Pas d'autres phages lytiques
- ✓ Pas de phages lysogéniques

Un seul type de phage **concentré**

- ✓ Sélection de la souche de production
- ✓ Optimisation des conditions de production

Un seul type de phage concentré **pur et stable**

- ✓ Élimination des débris/métabolites/
facteurs de virulence secrétés
- ✓ Tampon de conservation
- ✓ Conditions BPP (BPF-like)
- ✓ CQs
- ✓ Libération des lots

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

Programme

PHAGEinLYON 

Laboratoire de microbiologie



Pr. Frédéric
LAURENT



Mathieu
MEDINA



Dr. Floriane
LAUMAY



Leslie
BLAZERE



Tiphaine
LEGENDRE



Emilie
BELLUIN



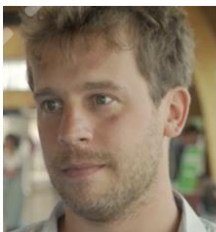
Mélanie
BONHOMME



Infectiologie



Pr. Tristan
FERRY



Dr. Florent
VALOUR



Pr. Sébastien
LUSTIG

Chirurgie

Pharmacie hospitalière



Dr. Gilles
LEBOUCHER



Dr. Thomas
BRIOT



Dr. Sylvain
GOUTELLE



Dr. Benjamine
LAPRAS



Pr. Fabrice
PIROT



Dr. Camille
MERIENNE

PHAG-ONE 



anr 
agence nationale
de la recherche



© RICAI 2021 Tous droits réservés



Pr. Frédéric LAURENT PU-PH, PharmD

- Expertise en microbiologie
- Expertise en caractérisation des phages
- Expertise en bioproduction des phages

Pr. Fabrice PIROT PUPH, PharmD

- Expertise en production pharmaceutique
- Expertise en contrôle qualité
- Expertise en formulation

Pr. Tristan FERRY PU-PH, MD Dr. Gilles LÉBOUCHER PH, PharmD

- Expertise en préparation magistrale des phages
- Expertise dans la sélection des cas
- Expertise en administration clinique



Organisation du projet PHAG-ONE

WP7 : Etude socio-antropologique

- Epistémologie / Perception grand public-décideurs-politiques
- Suivi de l'émergence d'une innovation biomédicale

WP1 : Isolement

- Isolement
- Caractérisation
- Entraînement

WP6 : Utilisation clinique

- Référentiel
- Etude de cohorte
- Essais cliniques

WP2 : Production

- Sélection souche de production
- Développement et validation process amplification phagique
- Contrôles qualité

WP5 : Diagnostic

- Titration
- Activité

WP3 : Purification

- Développement et validation process de purification
- Contrôles qualité
- Libération de lots
- Formulation / Stabilité

WP4 : Efficacité / PK-PD

- Modèle Lapin - Tissu Cage
- Modèle Lapin - Injection sur prothèse
- Etude pharmacodynamie

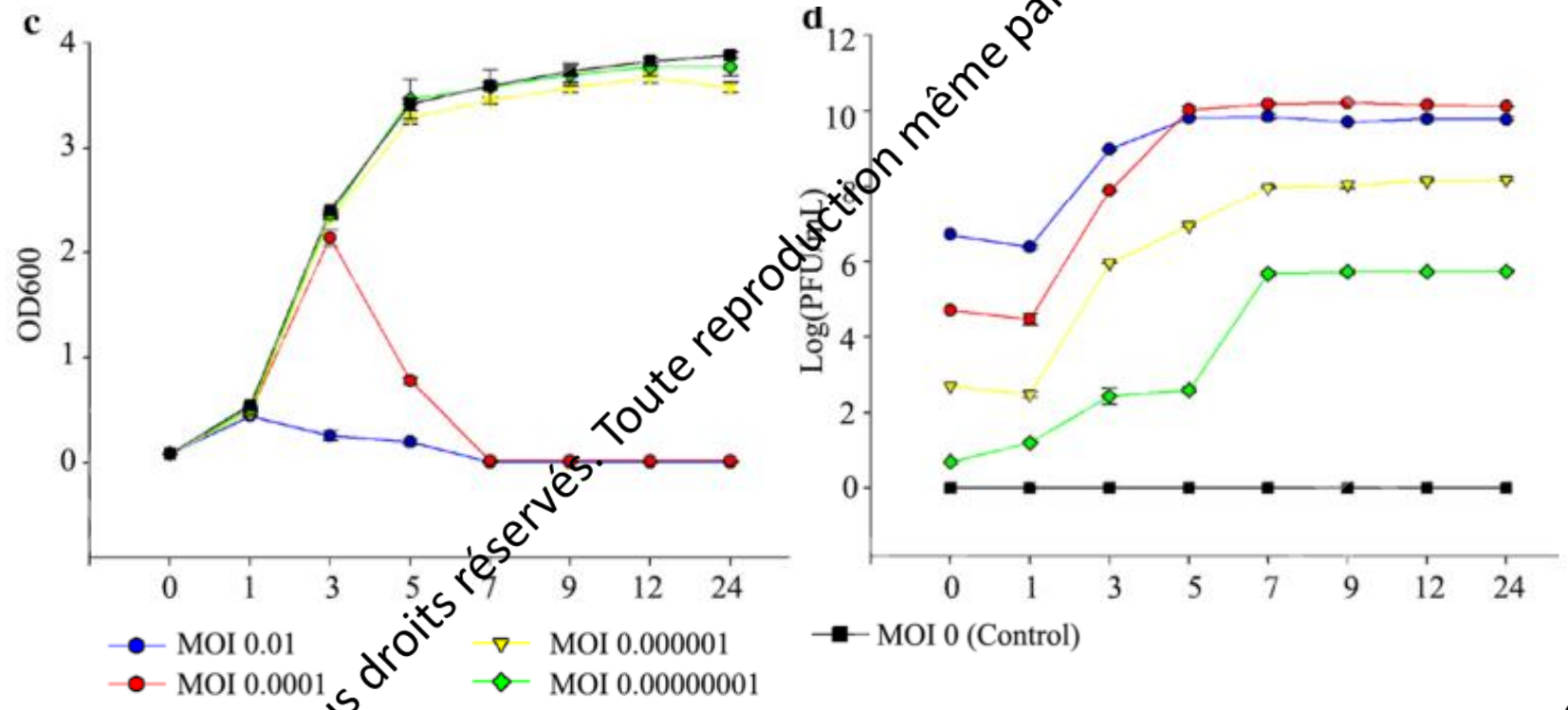
Safety

- Tolérance
- Toxicité



OPTIMISATION PRODUCTION

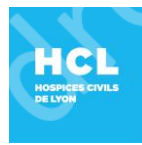
MULTIPLICITY OF INFECTION



Plus la MOI est haute, plus le maximum de production est atteint rapidement

© RICAI 2021 Tous droits réservés.

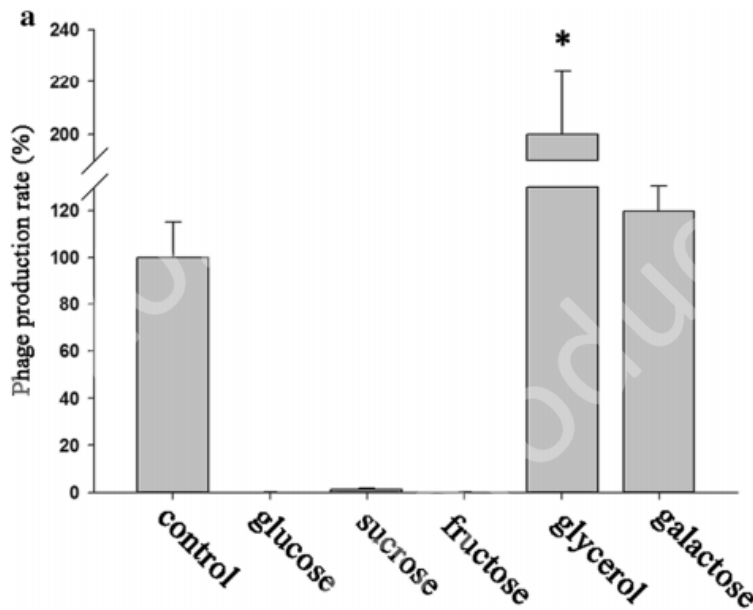
© RICAI 2021 Tous droits réservés.



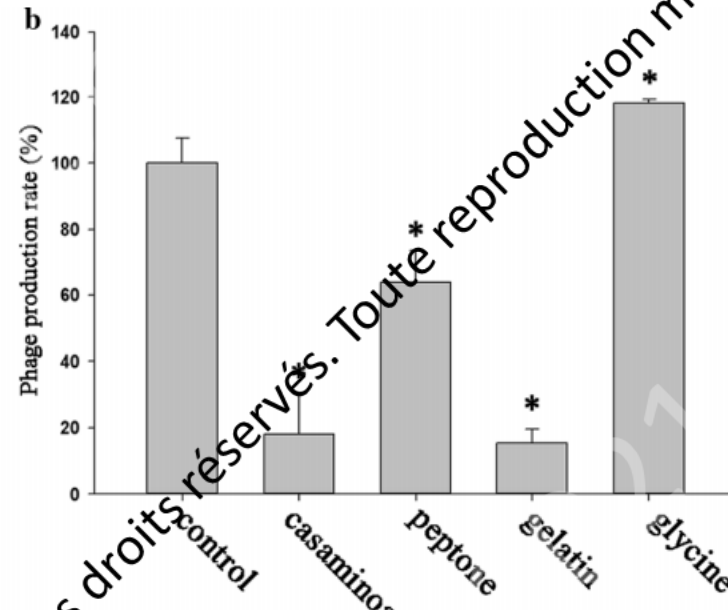
OPTIMISATION PRODUCTION

MILIEU DE CULTURE

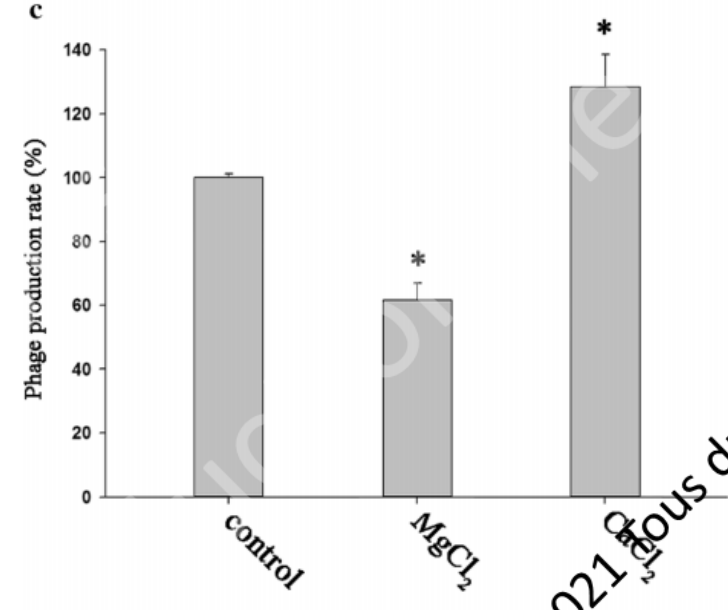
Sucres



Acides aminés



Ions



La composition du milieu impacte significativement les rendements de production

© RICAI 2021

© RICAI 2021

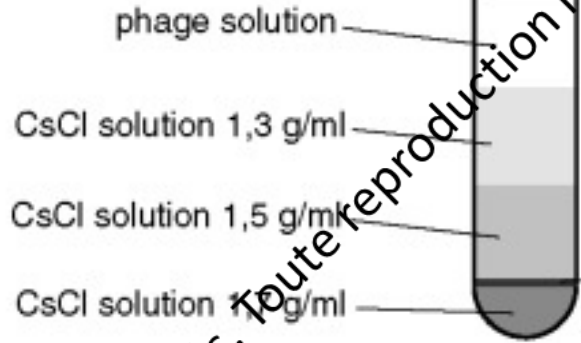


ULTRACENTRIFUGATION

Ultra-centrifugeuse



6 x 10 mL de phages
avec solutions de chlorure de césium



Ultra-centrifugation
(100,000 x g)

▲ phages
▼ débris

- ✓ Concentration des phages
- ✓ Élimination des résidus bactériens
- ✗ Faibles volumes et pas de transposition d'échelle