

Les bactériophages en pratique clinique : suivez le guide !

De l'approvisionnement à l'administration

Version Janvier 2021

Anthia MONRIBOT¹, Raphaëlle DELATTRE^{2,3}, Nicolas DUFOUR^{3,4}, Camille d'HUMIERES⁵, Nathalie PONS-KERJEAN¹, Julie BATAILLE¹

¹ Pharmacie à usage intérieur (PUI), Hôpital Beaujon AP-HP, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy

² Service d'anesthésie-réanimation, Hôpital Beaujon AP-HP, 100 boulevard du Général Leclerc, 92110 Clichy

³ Institut Pasteur, Department of Microbiology, Molecular Biology of Gene in Extremophiles, 75015 Paris

⁴ Service de Réanimation Médico-chirurgicale, Centre Hospitalier René Dubos, 95300 Pontoise

⁵ Laboratoire de bactériologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard AP-HP, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris

Avec le soutien du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM)



Table des matières

I	RESUME	4
II	INTRODUCTION	8
III	QUELQUES DONNEES GENERALES.....	9
III.1	LES BACTERIOPHAGES : DEFINITION	9
III.2	LE STATUT REGLEMENTAIRE DES BACTERIOPHAGES	11
III.3	LES MODALITES DE MISE A DISPOSITION DES SUSPENSIONS-LYOPHILISATS DE BACTERIOPHAGES	12
III.4	LA REGLEMENTATION RELATIVE A LA PRODUCTION ET LE CONTROLE DE LA QUALITE DES SUSPENSIONS-LYOPHILISATS DE BACTERIOPHAGES	14
III.5	LES DONNEES CLINIQUES D'EFFICACITE	15
III.6	SECURITE DE L'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BACTERIOPHAGES	17
III.7	LES DIFFERENTES SOURCES DE BACTERIOPHAGES THERAPEUTIQUES EN FRANCE ET EN EUROPE.....	20
IV	LES MODALITES DE L'ACCES A LA PHAGOTHERAPIE EN FRANCE.....	23
IV.1	LES SITUATIONS CLINIQUES POTENTIELLEMENT ELIGIBLES A UN TRAITEMENT PAR BACTERIOPHAGES	23
IV.2	INFORMATION DE L'ANSM QUANT AU PROJET D'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BACTERIOPHAGES ..	24
IV.3	DETERMINATION DE LA SENSIBILITE DES SOUCHES BACTERIENNES AUX BACTERIOPHAGES ET DE L'EFFICACITE A FORMER DES PLAGES DE LYSE	25
IV.4	ÉVALUATION DE LA QUALITE PHARMACEUTIQUE DES MATIERES PREMIERES DE BACTERIOPHAGES ET LES ETAPES DE PREPARATION – CONTROLE DE LA QUALITE PHARMACEUTIQUE DES PREPARATIONS TERMINEES	29
IV.5	ÉVALUATION DU PROJET D'ADMINISTRATION DE BACTERIOPHAGES THERAPEUTIQUES	37
IV.6	ASSOCIATION THERAPEUTIQUE BACTERIOPHAGES - ANTIBIOTIQUES	38
V	LES MODALITES PRATIQUES D'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES	39
V.1	LE TRANSPORT ET LE STOCKAGE DES DIFFERENTES FORMES DE BACTERIOPHAGES.....	39
V.2	LES MODALITES DE MANIPULATION DES BACTERIOPHAGES.....	39
V.3	LES MESURES D'HYGIENE ET DE PROTECTION LIEES A LA MANIPULATION DES PREPARATIONS DE BACTERIOPHAGES.....	42
V.4	LES MODALITES D'ADMINISTRATION DES BACTERIOPHAGES	43
V.5	LE FINANCEMENT DES PREPARATIONS DE BACTERIOPHAGES.....	43
VI	CONCLUSION	45
VII	LISTE DES ABREVIATIONS.....	47
VIII	DEFINITION DES TERMES UTILISES.....	48
IX	BIBLIOGRAPHIE	51
ANNEXE 1		57
ANNEXE 2		62
1.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION CUTANEE	62
2.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION ORL CHRONIQUE	66
3.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION URINAIRE.....	68
4.	ESSAI CLINIQUE CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN.....	69
5.	ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION DIGESTIVE.....	70
ANNEXE 3		74
ANNEXE 4		75
ANNEXE 5		76
LISTE DES TABLEAUX		79
LISTE DES FIGURES		79

Nous tenons à remercier le Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament (CNHIM) pour leur soutien dans ce projet.

Nous tenons à remercier la Direction Produits en charge des vaccins, des médicaments anti-infectieux, en hépato-gastroentérologie, en dermatologie, de thérapie génique et des maladies métaboliques rares (INFHEP), pôle MALINF de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé pour leur aide à la rédaction de ce document.

Nous remercions sincèrement le Professeur Jean-Hugues Trouvin pour son expertise dans les domaines de la réglementation et de la législation pharmaceutique, et ses multiples relectures.

Nous remercions également le Docteur Gilles Leboucher pour la relecture du document.

AVERTISSEMENT

Ce guide n'a pas pour but de se substituer au contenu d'un dossier d'AMM ou aux évaluations au cas par cas de l'ANSM. Il sera amené à évoluer selon la législation, les recommandations européennes et françaises, les retours d'expériences des praticiens et les résultats des études précliniques et cliniques.

I Résumé

La phagothérapie est l'usage médical des bactériophages, virus qui possèdent la particularité d'infecter exclusivement les bactéries. Les bactériophages ont des spectres étroits : ils sont spécifiques d'une espèce bactérienne voire de quelques souches et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce (1–4). Les bactériophages sont capables de présenter principalement deux types de cycles infectieux :

- **le cycle lytique**, propre aux **bactériophages virulents**, qui détruit la bactérie en détournant la machinerie bactérienne au profit de la synthèse protéique et génomique virale ;
- **le cycle lysogénique**, propre aux **bactériophages tempérés**. Ces virus présentent la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien, sans lyser systématiquement la bactérie. Ils peuvent donc conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non, comme des facteurs de virulence par exemple (1–4).

La phagothérapie se base uniquement sur l'utilisation de bactériophages virulents. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique, il est donc recommandé de vérifier l'absence de bactériophages tempérés dans le produit final, autrement dit la matière première-principe actif car ils sont de potentiels vecteurs de gènes indésirables (gènes de virulence ou d'antibiorésistance) (1–4).

Il existe différentes sources de bactériophages en France et en Europe (cf. III.7, liste non exhaustive). Les bactériophages sont disponibles sous forme de suspension ou de lyophilisat.

A ce jour, **l'utilisation des bactériophages est empirique, elle est principalement basée sur un rationnel pharmacodynamique d'efficacité**. Malgré leur large utilisation en Europe de l'Est, les données cliniques sont limitées. Des études expérimentales menées chez l'animal ont notamment démontré une efficacité des bactériophages pour le traitement d'infections bactériennes principalement respiratoires, cutanées et digestives induites par *P. aeruginosa*, *E. coli* ou *S. aureus* (5). La sécurité de la phagothérapie a également été démontrée dans des travaux précliniques et cliniques (6,7). Cependant, à ce jour, un nombre limité d'essais cliniques utilisant des bactériophages et conformes aux standards actuels en termes de recherche biomédicale ont été conduits : 1 mené chez des sujets sains, 4 menés chez des sujets malades (8–12). En France, **l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a encadré la mise à disposition de bactériophages** pour une quinzaine de patients depuis 2016. En majorité, il s'agissait d'infections ostéo-articulaires pour lesquelles des administrations locales *in situ* ont été réalisées (13).

L'Agence européenne du médicament (EMA) a admis en 2015 que le **traitement par les bactériophages s'inscrit dans le cadre réglementaire européen applicable aux médicaments biologiques, tel que défini dans la directive 2001/83/CE** du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 modifiée par la directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (14–16). Dans la même dynamique, l'ANSM a admis lors d'une réunion du comité scientifique spécialisé temporaire (CSST) sur la phagothérapie du 24/03/2016 que les **bactériophages relevaient de la**

réglementation applicable aux médicaments (17). Leur mise à disposition sera donc réalisée selon les statuts définis dans l'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique (CSP) (18).

Dans la mesure où **aucun développeur-industriel n'a introduit de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et en Europe** pour des suspensions-lyophilisats de bactériophages et dans un contexte de sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, **l'ANSM a encadré et autorisé la mise à disposition de suspensions-lyophilisats de bactériophages à titre compassionnel**. A ce jour, **la production-fabrication des suspensions-lyophilisats de bactériophages n'est pas réalisée selon un procédé industriel standardisé** à même de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces produits. **Les suspensions-lyophilisats de bactériophages produites** (à la demande ou « en série ») pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme **ne peuvent donc être considérées comme des médicaments au sens de la spécialité pharmaceutique**. Dans ce contexte, la mise à disposition des suspensions-lyophilisats ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel.

Dans ce dernier cas, il s'agira d'une mise à disposition :

- dans le cadre d'une **Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) nominative** ;
- selon le **statut des matières premières pharmaceutiques, utilisées pour réaliser une préparation magistrale** (Annexe 1). Les **pharmacies à usage intérieur (PUI) seront donc en charge de la préparation**, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique (reconstitution, dilution) de ces matières premières.

Lors d'une réunion du CSST de 2016 sur la phagothérapie à l'initiative de l'ANSM, **il a été acté que la prescription, la dispensation ainsi que l'administration de suspensions de bactériophages doivent être effectuées au sein d'un établissement de santé** (17).

Ainsi, une demande de bactériophages ne peut être **initiée que par un médecin hospitalier** et les **suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une PUI** d'un établissement de santé. L'administration des bactériophages sera réalisée sous la responsabilité du médecin prescripteur en charge du patient et du pharmacien hospitalier.

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus de mise à disposition des bactériophages. Une **discussion collégiale** doit ainsi être menée autour du cas afin d'analyser **l'histoire clinique et thérapeutique du patient, le rapport bénéfice/risque d'une thérapie par bactériophages**.

En 2016, le CSST a décidé consensuellement des **critères justifiant une situation de besoin, applicable à tout type d'infection et justifiant un accès aux bactériophages** :

- **un pronostic vital engagé** ou un pronostic fonctionnel menacé ;
- une **situation d'impasse thérapeutique** (« situation de sauvetage ») ;
- une **infection monomicrobienne**.

Par ailleurs, au regard des données à ce jour limitées permettant de sous-tendre l'utilisation des bactériophages, **il a été acquis la nécessité de disposer des données d'efficacité *in vitro*, notamment d'un phagogramme**, avant la décision d'une mise sous traitement. **Le phagogramme a pour objectif** de tester **la sensibilité de la souche bactérienne** vis-à-vis d'un ou de plusieurs bactériophages candidats qui sont détenus dans une phagothèque (17).

Néanmoins, l'expérience clinique sur les bactériophages acquise au cours de ces 2 dernières années ont fait évoluer les indications de la phagothérapie. Ainsi, des cas pratiques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages ont été définis :

- **une résistance bactérienne aux antibiotiques** ;
- une infection dont le germe reste sensible à certains antibiotiques mais dont la **morbidité liée au traitement** n'est pas acceptable (néphrotoxicité, allergie, etc.) ;
- **une inefficacité clinique des antibiotiques** : infection difficile à éradiquer avec un passage à la chronicité.

De plus, **des discussions devront être menées afin de déterminer la voie d'administration, la composition de la solution en principe actif et excipients** (concentration, nombre de bactériophages différents, etc.), **la forme galénique ainsi que les dispositifs médicaux (DM)** utilisés lors de l'administration (en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques et techniques des DM ainsi que les interactions potentielles entre ces DM et les bactériophages). La voie d'administration devra permettre de concentrer les bactériophages au niveau du site infecté tout en restant compatible avec les caractéristiques pharmaceutiques des cocktails de bactériophages. Ainsi, l'administration locale de bactériophages pourrait être considérée comme la plus sécuritaire selon les données disponibles avec l'avantage de connaître la quantité de bactériophages délivrée au site de l'infection. Lors de la réunion du CSST de 2019, il a été admis par l'ensemble des experts que la voie orale était exclue, ainsi que la voie intrathécale *a priori* (13).

Le pharmacien hospitalier est en charge de l'évaluation de la qualité pharmaceutique de la matière première. Il convient de rappeler que les contrôles principaux sur la qualité pharmaceutique des matières premières-substances actives de bactériophages doivent être réalisés par le fabricant-industriel-développeur, conformément à la réglementation en vigueur. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique le **bulletin de contrôle de la matière première fourni par le fabricant**, pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation de cette substance active chez l'Homme. Les informations et contrôles indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières-substances actives, qui doivent être détaillés sur le bulletin de contrôle, sont listés dans ce guide. Après avoir validé la qualité pharmaceutique de la matière première, **le pharmacien hospitalier réalisera les étapes de préparation** (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration)

conformément aux **Bonnes Pratiques de Préparation (BPP)** au sein de la PUI. Il réalisera également un **contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale (ou hospitalière) terminée de bactériophages**, afin de permettre son administration chez l'Homme (19).

II Introduction

La phagothérapie est l'usage médical des bactériophages, virus qui possèdent la particularité d'infecter exclusivement les bactéries. Mise en œuvre dès les années 1930, cette thérapeutique a été abandonnée en Occident au profit de l'antibiothérapie. Néanmoins, elle a continué à être pratiquée en Europe de l'Est. L'utilisation des bactériophages émerge de nouveau dans l'arsenal thérapeutique comme une alternative potentielle à l'antibiothérapie (ou en complément de cette dernière), au regard des situations d'impasses thérapeutiques, compte tenu de la multi-résistance croissante, des tensions d'approvisionnement et d'un besoin non satisfait en nouveaux antibiotiques.

A ce jour, l'utilisation thérapeutique des bactériophages est empirique. Malgré leur large utilisation en Europe de l'est, les données cliniques sont limitées. Très peu d'essais cliniques conformes aux standards actuels en termes de recherche biomédicale ont été conduits (randomisation, essais contrôlés, double aveugle...).

Actuellement, il n'existe pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et en Europe pour des bactériophages qui pourraient être utilisés comme médicament (au sens de la spécialité pharmaceutique selon la législation française) dans des indications en infectiologie. Les recommandations spécifiques européennes sur le développement des bactériophages en termes de production et de qualité pharmaceutique (contrôle qualité) sont peu nombreuses. Le cadre réglementaire actuel doit donc s'adapter aux situations cliniques particulières (situation d'urgence, patients en situation d'impasse thérapeutique, pronostic vital et fonctionnel engagé) et aux spécificités des cocktails de bactériophages « sur mesure » (approche personnalisée).

Dans ce contexte et face aux interrogations et sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, nous avons souhaité élaborer un guide pratique sur l'utilisation thérapeutique des bactériophages. L'objectif de ce travail est double :

- informer sur l'état actuel des connaissances relatives à cette thérapeutique et à sa réglementation ;
- encadrer l'utilisation des bactériophages en décrivant chacune des étapes, de la production à l'administration dans le but de garantir la qualité, l'efficacité et la sécurité de cette thérapeutique.

III Quelques données générales

III.1 Les bactériophages : définition

Les bactériophages sont des virus infectant spécifiquement les bactéries et ne possédant pas la capacité d'infecter les cellules eucaryotes (1,3,4,20). Les bactériophages ont des spectres étroits : ils sont spécifiques d'une espèce bactérienne voire de quelques souches et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce. Ils sont présents en grande quantité là où des bactéries sont présentes. Les bactériophages sont donc présents dans l'ensemble de la biosphère : eaux, sols, plantes, alimentation, sur la peau, dans notre tube digestif, sur nos muqueuses (21–23). La grande majorité (96%) des bactériophages appartient à l'ordre des *Caudovirales* (virus avec une queue) et sont le plus souvent des virus à ADN double brin, non enveloppés. Les bactériophages d'intérêt pour la phagothérapie appartiennent très majoritairement à trois familles : *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae* (1,20,24).

Comme illustré sur la **Figure 1**, ils sont constitués :

- d'une capsid protéique protégeant leur génome (ADN-ARN) ;
- d'une queue de longueur variable ;
- de fibres de queue permettant l'interaction du virus avec les récepteurs spécifiques de l'hôte.

Ils mesurent en moyenne entre 24 et 200 nanomètres (24).

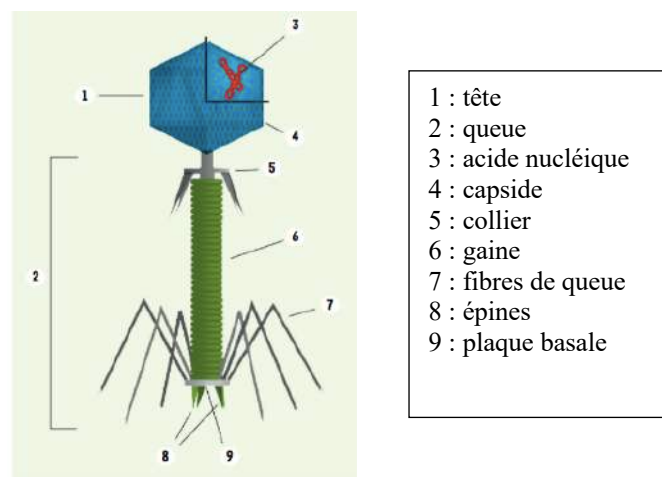


Figure 1. Structure du bactériophage T4 (1)

Les bactériophages sont capables de présenter principalement deux types de cycles infectieux en fonction des informations codées dans leur génome et de l'état métabolique des cellules infectées comme illustré dans la **Figure 2**. (1,3,4,20).

Les bactériophages virulents détruisent la bactérie en détournant la machinerie bactérienne au profit de

la synthèse protéique et génomique virale. Les protéines structurales virales et le génome viral sont produits en grande quantité, respectivement assemblées et encapsidées, aboutissant ainsi à la formation de virions matures. Au terme de ce **processus lytique**, la lyse bactérienne va libérer plusieurs dizaines de virions. Ce phénomène d'amplification au niveau du site infectieux est une propriété tout à fait originale de la phagothérapie par rapport à l'antibiothérapie (1–4).

Le cycle lysogénique est propre aux **bactériophages tempérés**. Ces derniers ont la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien, sans altérer la viabilité bactérienne. Le génome viral est répliqué à chaque division cellulaire et transmis à la descendance. Ces bactériophages peuvent donc conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non, comme des facteurs de virulence par exemple. Ils peuvent rester quiescents très longtemps, mais peuvent en cas de stress physiologique (irradiation UV, mytomycine, déplétion énergétique du milieu), s'exciser du génome bactérien et débiter un cycle infectieux lytique (1–4).

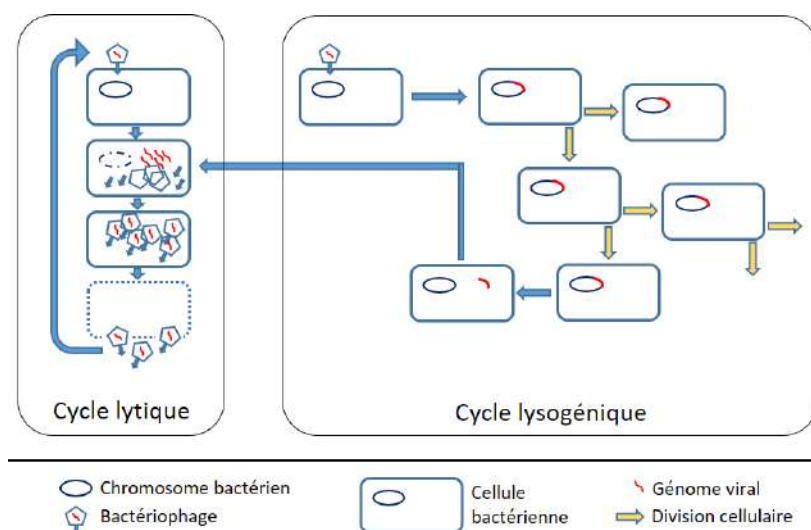


Figure 2. Les principaux cycles infectieux des bactériophages (2)

Ainsi, la phagothérapie, de par son mode d'action attendu, impose l'utilisation exclusive de bactériophages virulents pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme. Lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique, **il est en effet recommandé de vérifier l'absence de bactériophages tempérés dans la suspension-lyophilisat de bactériophages produit(e), autrement dit la matière première-principe actif** (via l'analyse du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages de la suspension), car ils sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le patient (gène de virulence ou d'antibiorésistance). Cette élimination des bactériophages tempérés est notamment

faite en vérifiant l'absence de possibilité d'intégration du génome du bactériophage au génome bactérien (le mode opératoire est détaillé au chapitre IV.4.b).

III.2 Le statut réglementaire des bactériophages

L'Agence européenne du médicament (EMA) a organisé un colloque sur les bactériophages le 8 juin 2015 (« *Workshop on the therapeutic use of bacteriophages* ») avec pour objectif d'échanger sur les problématiques liées aux développements des traitements par bactériophages. Au cours de cette journée, le cadre réglementaire, les aspects qualité ainsi que l'état d'avancement du développement clinique ont été discutés (16).

Il a été admis lors de ce colloque que le **traitement par les bactériophages s'inscrit dans le cadre réglementaire européen applicable aux médicaments biologiques, tel que défini dans la directive 2001/83/CE** du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 modifiée par la directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Cette directive impose qu'une AMM soit délivrée (14,15). La présente directive s'applique aux médicaments à usage humain, plus précisément aux spécialités pharmaceutiques, destinés à être mis sur le marché dans les États membres et préparés industriellement ou fabriqués selon une méthode dans laquelle intervient un processus industriel (25). Conformément à celle-ci, le dossier d'AMM doit comporter des données pharmaceutiques, précliniques et cliniques détaillées. Il a par ailleurs été confirmé que les bactériophages non génétiquement modifiés ne répondaient pas, de par leur mode d'action et leur origine, à la classification de médicament de thérapie innovante (MTI) (16).

Dans la même dynamique, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a créé le 24/03/2016 un comité scientifique spécialisé temporaire sur la phagothérapie (CSST)¹. Il a été admis lors de ce CSST que les **bactériophages relèvent de la réglementation applicable aux médicaments** (14,15,17).

Dans la mesure où **aucun développeur - industriel n'a introduit une demande d'AMM** en France et en Europe pour des suspensions-lyophilisats de bactériophages et dans un contexte de sollicitations croissantes émanant des communautés scientifiques et médicales, l'ANSM a encadré et autorisé la mise à disposition de suspensions-lyophilisats de bactériophages à titre compassionnel, selon des procédures dérogatoires, sous le statut de matières premières (principe actif), pouvant être utilisées comme composants d'une préparation magistrale. A ce jour, la production-fabrication des suspensions-lyophilisats de bactériophages

¹http://ansm.sante.fr/content/download/91159/1144681/version/1/file/CR_CSST_Phagothérapie_CSST20161101_3_24-03-2016.pdf.

n'est pas réalisée selon un procédé industriel, permettant de garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité de ces produits. Il s'agit d'une production pouvant être qualifiée « d'expérimentale ». Les suspensions-lyophilisats de bactériophages produites (à la demande ou « en série ») pour le traitement d'infections bactériennes chez l'homme, ne peuvent donc être considérées comme des médicaments au sens de la spécialité pharmaceutique, mais peuvent être mises à disposition selon le statut de matière première (25). Les **pharmacies à usage intérieur (PUI) seront en charge de la préparation**, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique : reconstitution, dilution de ces matières premières.

III.3 Les modalités de mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages

La mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages sera réalisée selon les statuts définis dans l'article L.5111-1 du code de la santé publique (CSP) (18).

Lors du CSST de 2016 sur la phagothérapie de l'ANSM, **il a été acté que la prescription, la dispensation ainsi que l'administration de suspensions de bactériophages doivent être effectuées au sein d'un établissement de santé** (17).

Ainsi, une demande de bactériophages ne peut être **initiée que par un médecin hospitalier** et les **suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une PUI** d'un établissement de santé. La suspension - lyophilisat de bactériophages, produite sur la base de la prescription initiale, sera reçue par la PUI qui devra alors assurer la mise en forme pharmaceutique afin de « faciliter » l'administration de la suspension. L'administration des bactériophages sera réalisée sous la responsabilité du médecin prescripteur en charge du patient et du pharmacien hospitalier.

Actuellement, aucun développeur n'a déposé de dossier de demande d'AMM en France et en Europe, pour une suspension de bactériophages. Il n'existe donc pas de « spécialités pharmaceutiques », de produits finis, à base de bactériophages sur le marché.

Au vu de ces éléments, les aspects réglementaires doivent être appréhendés **au regard du contexte clinique**. En effet, les demandes de bactériophages sont réalisées dans un contexte d'urgence puisqu'elles s'adressent à des patients en situation d'impasse thérapeutique en raison d'une multi-résistance aux antibiotiques à l'origine d'échecs aux traitements anti-infectieux disponibles sur le marché, avec un pronostic vital et/ou fonctionnel engagé. Le dispositif réglementaire sera également fonction :

- des **données** documentant la **qualité pharmaceutique intrinsèque du produit** garantie par un développement scientifique approfondi qui peut éventuellement s'appuyer sur des monographies ou autres textes de référence comme des guidelines, qui permettront d'identifier les éléments critiques qui contribuent à la qualité intrinsèque de la suspension-lyophilisat de bactériophages (identité, pureté, activité biologique et dose) ;

- **du référentiel de qualité** appliqué lors de la production et des étapes de contrôle avant libération (Bonnes pratiques de fabrication (BPF), Monographie...) ;
- **de la localisation géographique** de l'établissement assurant la production/contrôle et libération des suspensions-lyophilisats de bactériophages : France, pays de l'Union européenne, hors UE, etc.

Dans ce contexte, la **mise à disposition des suspensions-lyophilisats ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel. Dans ce dernier cas, il s'agira d'une mise à disposition :**

- dans le cadre d'**Autorisation Temporaire Utilisation (ATU) nominative** ;
- selon le **statut de matières premières pharmaceutiques, utilisées pour réaliser une préparation magistrale** (Annexe 1).

La mise à disposition de suspensions-lyophilisat de bactériophages peut être réalisée dans le cadre d'une **ATU nominative pour des préparations pour lesquelles la qualité intrinsèque est garantie par un développement pharmaceutique pertinent (le cas échéant encadré par des monographies et autres guidelines) et une stratégie de contrôle qualité qui permet d'assurer la qualité finale de la suspension-lyophilisat de bactériophage en termes d'identité, de pureté et d'activité, et dont la production industrielle est réalisée dans un établissement certifiée BPF.** En effet, la demande tendant à obtenir une ATU, déposée par le titulaire des droits d'exploitation ou son mandataire à l'ANSM, est accompagnée notamment :

- d'un dossier présentant les données relatives à la qualité pharmaceutique du médicament telle qu'elle est documentée dans le dossier d'AMM (module 3 du Common Technical Document) ;
- d'une copie de la demande d'AMM ou, lorsqu'elle n'a pas été déposée, une lettre du demandeur de l'autorisation temporaire d'utilisation s'engageant à déposer une telle demande dans un délai déterminé (26).

Ainsi l'ATU, s'applique exclusivement à un « candidat médicament spécialité pharmaceutique ». A ce jour, l'ANSM ne peut être amenée à octroyer des ATU en l'absence de suspensions-lyophilisats de bactériophages répondant à ces standards de qualité et de production industrielle.

Pour **les suspensions-lyophilisats de bactériophages qui ne disposent pas du statut de spécialité pharmaceutique-produit fini, et ne pouvant faire l'objet d'une ATU, une mise à disposition à titre compassionnel selon le statut de matières premières pharmaceutiques peut être envisagée.** L'hôpital militaire de la Reine Astrid à Bruxelles (HMRA) produit des suspensions ou lyophilisats de bactériophages, plus précisément des « *active pharmaceutical ingredient* » (API) qui peuvent être utilisés comme **des composants** ou « matières premières » d'une préparation magistrale ou hospitalière (27). Il s'agit de bactériophages caractérisés, lytiques, actifs sur une souche bactérienne.

Des étapes de préparation (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) ainsi qu'un contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale de bactériophages devront être réalisés par le pharmacien hospitalier de la PUI, sachant que les contrôles principaux sur la qualité de l'API seront réalisés par l'équipe de l'HMRA, conformément à la réglementation en vigueur qui impose à tout fournisseur d'apporter un bulletin de contrôle de la matière qu'il fournit. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique ce bulletin de contrôle pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation chez l'Homme de cette API. Les contrôles réalisés sur les API par l'HMRA sont détaillés dans la Monographie générale des bactériophages nationale belge (27–31). A noter que Pherecydes Pharma® produit des suspensions de bactériophages pouvant être mises à disposition selon le statut de matières premières. Il convient de rappeler que si la substance est considérée comme une matière première, il est attendu que le fabricant de matière première à usage pharmaceutique (MPUP) soit autorisé par l'ANSM (ou l'autorité de contrôle du pays dans lequel est implanté l'établissement de fabrication), à réaliser les activités de fabrication, d'importation et de distribution des substances actives.

La mise à disposition des suspensions-lyophilisats de bactériophages doit, autant que possible, être privilégiée dans le cadre d'un essai clinique par rapport à une utilisation compassionnelle.

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus de mise à disposition des bactériophages. Une discussion collégiale doit être menée autour du cas afin d'analyser l'histoire clinique et thérapeutique du patient, le rapport bénéfice/risque d'une thérapie par bactériophages, et d'évaluer la qualité pharmaceutique de la substance au regard des informations fournies sur le produit.

III.4 La réglementation relative à la production et le contrôle de la qualité des suspensions-lyophilisats de bactériophages

Actuellement, il n'existe pas de recommandations spécifiques européennes portant sur la production ou les exigences en matière de qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages, c'est-à-dire des matières premières de bactériophages. Il ne peut donc pas être fait référence à des recommandations spécifiques « bactériophages ». Cependant, il est possible de faire référence à des textes existants et publications pour la production et le contrôle de la qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages tels que :

- en 2015, un groupe international composé de 29 « experts en bactériophages » de dix pays a défini des exigences en matière de qualité, de sécurité et d'efficacité pour les préparations de bactériophages (32) ;
- la directive européenne relative aux tissus et cellules (EUTCD) (33–35);
- les recommandations CHMP/ICH/294/95 Q5D (36) sur les substrats cellulaires et leur utilisation dans les productions de substances biologiques ;

- le texte de la Food and Drug Administration (FDA) : « *Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications* » (37) ;
- la Monographie générale des bactériophages nationale belge rédigée par l'équipe de l'HMRA et validée par l'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS) en janvier 2018 (27,30) ;
- de multiples publications (28,31,38–41).

Compte tenu de tous ces éléments initiaux sur la démarche qualité pour un produit biologique, les développeurs de suspensions-lyophilisats de bactériophages disposent donc d'un arsenal déjà conséquent pour établir les termes de référence de leur propre procédé et stratégie de contrôle des suspensions-lyophilisats de bactériophages qu'ils envisagent de produire. Aussi, pour les étapes de production et de contrôle, les critères d'acceptabilité seront donc adaptés et justifiés à leur propre produit.

III.5 Les données cliniques d'efficacité

Dans l'état actuel des connaissances, il existe **peu de données sur l'efficacité clinique des bactériophages** selon le mode d'administration et la posologie. Lors du colloque de l'EMA sur les bactériophages, le manque considérable de preuves scientifiques pour démontrer l'efficacité et la sécurité des bactériophages a été souligné (16). L'expérience clinique acquise sur les bactériophages depuis plusieurs années dans les pays de l'Est ne peut, à elle seule, constituer, sur un principe d'antériorité, un niveau d'efficacité et de sécurité suffisant. En effet, très peu de données ont été publiées sur cette large utilisation thérapeutique des bactériophages. Certaines publications rapportent que cette absence de communication s'explique en partie par la guerre froide, le gouvernement de l'ex-URSS n'autorisant les chercheurs à communiquer leur savoir-faire et leurs découvertes seulement dans des revues nationales c'est-à-dire en langue géorgienne ou russe (1,3,4). De plus, les rares travaux publiés ne respectent pas les standards actuels de la recherche clinique.

L'utilisation des bactériophages est donc empirique, elle est principalement basée sur un rationnel pharmacodynamique d'efficacité. A ce titre, et malgré l'antériorité, la notion d'usage médical bien établi, tel que prévu par la réglementation européenne, ne peut pas servir de base actuellement à l'octroi d'une AMM.

L'ANSM, tout comme l'EMA, encourage fortement la réalisation d'essais cliniques évaluant les bactériophages (16,17). Seuls des essais cliniques avec une randomisation et des critères de jugement pertinents permettraient d'apporter la preuve scientifique de l'efficacité clinique et de la sécurité des bactériophages dans les différents contextes cliniques (indications) qui auraient été étudiés par ces essais cliniques. En effet, par définition l'essai clinique permet de définir un protocole expérimental (idéalement randomisé) dans le but de minimiser au maximum les biais et de pouvoir porter à la fin de l'expérimentation un jugement de causalité.

De nombreuses études expérimentales ont été réalisées chez l'animal. Un certain nombre d'articles ont été publiés au cours de ces 20 dernières années démontrant, pour la grande majorité d'entre eux, l'efficacité des bactériophages dans différents types d'infections notamment pour le traitement d'infections bactériennes notamment respiratoires, cutanées, digestives induites par *P. aeruginosa*, *E. coli* ou *S. aureus* (5).

Les modèles animaux peuvent permettre de vérifier que les bactériophages sont actifs *in vivo* sur un panel de souches bactériennes et de proposer un schéma posologique en clinique. Ainsi, l'évaluation de la phagothérapie peut s'appuyer sur des éléments prédictifs (efficacité, résistance) que peuvent fournir les modèles animaux expérimentaux. Cependant, la méthodologie de ces études ainsi que le choix des bactériophages, du modèle animal, du couple « bactéries-bactériophages » est fondamental afin que les résultats de ces études expérimentales soient exploitables pour être ensuite transposés dans un essai clinique qui restera toujours nécessaire pour évaluer la sécurité et l'efficacité chez l'Homme et dans la situation clinique revendiquée.

A ce jour, les essais cliniques utilisant des bactériophages et conduits selon les standards en matière de recherche biomédicale (double aveugle, randomisé, contrôlé) sont au nombre de cinq : 1 mené chez des sujets sains, 4 menés chez des sujets malades (8–12). Ces essais sont résumés dans l'Annexe 2.

Deux programmes hospitaliers de recherche clinique sont sur le point d'être engagés :

- le projet PHAGOS : essai clinique de phase I/II, multicentrique, randomisé, en ouvert, contrôlé *versus* traitement standard, dont l'objectif est d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la phagothérapie associée au traitement standard (chirurgie et antibiotiques) dans les infections chroniques de prothèses de hanche ou de genou à *Staphylococcus* (42) ;
- le projet PHAGOPIED : essai clinique de phase I/II, randomisé, multicentrique, contrôlé *versus* placebo, en double aveugle, de supériorité visant à comparer l'efficacité d'un traitement standard associé à des bactériophages *versus* un traitement standard associé à un placebo dans le traitement des ulcères du pied infectés à *S. aureus* chez les patients diabétiques (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02664740) (43).

Il convient de préciser que dans un contexte de sollicitations croissantes, **l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a encadré la mise à disposition de bactériophages** pour une quinzaine de patients depuis 2016. En majorité, il s'agissait d'infections ostéo-articulaires pour lesquelles des administrations locales *in situ* de phages ont été réalisées (13).

III.6 Sécurité de l'utilisation thérapeutique des bactériophages

III.6.a Les bactériophages tempérés

Le principal risque lié à la phagothérapie est de trouver en présence de bactériophages tempérés dans une préparation thérapeutique. En effet, les bactériophages tempérés présentent la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien sans tuer son hôte. Ils sont donc de potentiels vecteurs de gènes de virulence ou d'antibiorésistance et peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie, bénéfiques ou non.

En thérapeutique, il est ainsi impératif d'utiliser des bactériophages lytiques caractérisés et de vérifier par ailleurs l'absence de bactériophages tempérés dans **la suspension-lyophilisat produit, autrement dit la matière première-principe actif de bactériophages** (28,44). Des investigations doivent être menées par le biais notamment d'analyses du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la suspension afin de limiter le risque lié à la présence de bactériophages tempérés, potentiellement et indirectement pathogènes pour l'homme.

III.6.b Les risques pour le patient

Les bactériophages ne possèdent pas la capacité d'infecter les cellules eucaryotes et ne présentent donc pas d'effets reprotoxiques et mutagènes. L'analyse des données de la littérature n'a pas mis en évidence une toxicité physico-chimique des bactériophages à l'origine de lésions tissulaires.

Les bactériophages étant des virus, leur administration peut provoquer une réaction immunitaire. Cette réaction, potentiellement néfaste, peut mettre en jeu soit les mécanismes de **l'immunité innée** avec la sécrétion de cytokines et le recrutement de cellules pro-inflammatoires, soit ceux de **l'immunité adaptative** avec la synthèse d'anticorps. L'immunogénicité directe des bactériophages impliquant les mécanismes de l'immunité innée semble négligeable dès lors que les suspensions sont correctement purifiées, comme en témoigne les expérimentations chez l'animal ainsi que les 2 études réalisées par Nestlé® avec le cocktail de bactériophages T4 et le cocktail Microgen® citées précédemment dans l'Annexe 2 (8,9,45).

Par ailleurs, **la lyse bactérienne** suite à l'action des bactériophages est à l'origine de la libération d'ADN bactérien, d'endotoxines et de composants bactériens membranaires tels que l'acide lipoteichoïque et le peptidoglycane. Ces protéines sont de puissants antigènes pouvant être immunogènes chez l'homme. Il convient de rappeler que la libération d'endotoxines est une étape clé dans la physiopathologie du sepsis et du choc septique. La lyse bactérienne pourrait donc être à l'origine de réactions immunitaires indirectes, par la libération de composants antigéniques. Une étude récente menée par Dufour et *al* a comparé, *in vitro*, la libération d'endotoxines et la capacité à tuer les bactéries : de bactériophages thérapeutiques versus 4 traitements antibiotiques (7). Les résultats ont montré que les bactériophages sont à l'origine d'une lyse bactérienne plus rapide que celle provoquée par l'action des β -lactamines et que la concentration en endotoxines cumulée générée suite à l'action de ces bactériophages sur des souches bactériennes est

inférieure à celle générée suite à l'action des β -lactamines (7). Les mêmes auteurs ont également montré, cette fois *in vivo* chez l'animal (modèle de pneumonie aiguë), que l'administration de deux bactériophages ne s'accompagnaient pas d'une augmentation de la synthèse de cytokines de l'inflammation aiguë. Au contraire, de façon identique (voir supérieure) à ce qui était observée chez les animaux traités par des antibiotiques de référence, le traitement par phages diminuait l'inflammation chez les animaux infectés (6).

Le second mécanisme immunogène serait l'induction d'une réponse humorale avec la production d'anticorps neutralisants. Le développement de ces anticorps anti-phages pourrait être à l'origine d'une inefficacité d'un futur traitement basé sur les bactériophages sources de l'immunisation. Cependant, M. Żaczek et al. ont montré que la production d'anticorps ne semblait pas influencer le pronostic infectieux et l'efficacité du traitement (46). Dans une autre étude sur 15 volontaires sains ayant reçu un cocktail de bactériophages T4, aucun n'a développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage testé (8).

Les essais cliniques cités précédemment ne mettent pas en évidence d'effet indésirable particulier. Les profils de tolérance de chacune des suspensions de bactériophages administrées par diverses voies sont acceptables (cf. Annexe 2). Les données de tolérance dont nous disposons sont principalement issues d'études chez l'animal et des 5 essais cliniques conduits selon une méthodologie suffisante. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires.

Malgré l'expérience clinique abondante dont disposent les pays de l'est, le nombre limité de publications sur cette large utilisation thérapeutique des bactériophages ne permet pas d'exclure d'éventuels signaux de vigilance relatifs à la tolérance et à la sécurité de l'administration des bactériophages.

En résumé, les potentiels risques et effets indésirables liés à l'administration de bactériophages sont :

- une inefficacité des bactériophages choisis et sélectionnés sur la base de la sensibilité de la souche bactérienne visée, pour le traitement des infections bactériennes en lien avec le développement d'une résistance bactérienne aux bactériophages (47) ;
- une production d'anticorps anti-phages spécifiques en lien avec une réponse immune adaptative de type humorale ;
- une réaction inflammatoire aiguë en lien avec une réponse immune innée ;
- une réaction immunitaire liée à la libération de composés antigéniques lors de la lyse bactérienne.

III.6.c Les risques associés à la manipulation des bactériophages

Il est important de se questionner sur les règles de prévention et les exigences requises pour la manipulation des bactériophages. Il existe un classement des micro-organismes naturels qui concerne les bactéries, les virus, les parasites et les champignons (48). Les critères de ce classement sont présentés dans le **Tableau I**.

Il existe 4 groupes selon la pathogénicité du micro-organisme, l'existence ou non d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace. La connaissance des agents biologiques et de leur classement conditionne les règles de prévention, notamment les niveaux de confinement 1, 2, 3 ou 4, requis pour leur manipulation.

Tableau I. Groupe de risque : du plus faible (1) au plus important (4) (48)

Critère	GROUPE 1	GROUPE 2	GROUPE 3	GROUPE 4
Pathogène chez l'homme	Non	Oui probable	Oui Maladie grave	Oui Maladie très grave
Dangereux pour l'opérateur	Sans objet	Oui Modérément	Oui Risque élevé	Oui Risque très élevé
Propagation	Sans objet	Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement	Sans objet	Oui	Oui généralement	Non
Exemples	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> non pathogène	Virus de la rougeole <i>Clostridium tetani</i>	VIH, VHB <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Virus Ebola Virus de la variole

Les bactériophages thérapeutiques appartiennent au groupe 1 de la classification des agents biologiques (28,44). Ils ne sont pas pathogènes pour l'homme de façon directe. Néanmoins, ils peuvent transférer des facteurs de virulences, des toxines à un autre hôte : la bactérie. Par ce transfert, ils augmentent la virulence des bactéries. Ainsi les bactériophages pourraient être des vecteurs de maladie, mais un hôte intermédiaire est nécessaire. Le principal risque des bactériophages doit donc être considéré par rapport à l'environnement.

Le niveau de sécurité biologique sera également fonction de la souche bactérienne utilisée lors des différentes étapes de production de bactériophages (isolement, sélection, amplification, purification). Une production de bactériophages avec une bactérie de type *E. coli* O157:H7² devra être réalisée au sein d'un laboratoire confiné de niveau de sécurité biologique 2, tandis qu'une production avec une souche *E. coli* non pathogène devra être réalisée au sein d'un laboratoire confiné de niveau de sécurité biologique 1.

² *E. coli* O157:H7 est un des sérotypes d' *E. coli* entérohémorragiques ou EHEC. Les EHEC colonisent le tube digestif puis libèrent des toxines (Shigatoxines) pouvant induire des lésions vasculaires aux niveaux intestinal, rénal et cérébral. Les EHEC peuvent donc être responsables de troubles variés, allant d'une diarrhée bénigne à des formes plus graves comme des diarrhées hémorragiques et/ou des atteintes rénales sévères appelées syndrome hémolytique et urémique (SHU) principalement chez le jeune enfant ou micro-angiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte.

III.7 Les différentes sources de bactériophages thérapeutiques en France et en Europe

A ce jour, les bactériophages disponibles ne permettent pas de couvrir l'intégralité des souches bactériennes pathogènes susceptibles d'être rencontrées en pratique clinique en situation de multirésistance. Il demeure que la diversité et le nombre de bactériophages disponibles au sein des banques (phagothèques) sont limités. Or, il convient de rappeler que la production de bactériophages est un processus long et complexe qui se décompose en plusieurs étapes : l'isolement du phage d'intérêt (sauf si la souche pertinente existe déjà dans une phagothèque), sa caractérisation, sa qualification et sa production en quantité suffisante.

Les différentes sources de bactériophages disponibles en France et en Europe sont présentées ci-dessous (liste non exhaustive).

III.7.a Bactériophages de la société Pherecydes Pharma® (France)

Start-up française, Pherecydes Pharma® a été créée pour développer des solutions thérapeutiques à base de bactériophages pour le traitement des infections bactériennes. Pherecydes Pharma® a ainsi mis au point des technologies pour sélectionner et produire des bactériophages actifs contre les bactéries résistantes et multi-résistantes et dispose d'une collection limitée de bactériophages. Les procédés d'isolement, de caractérisation, de purification et de production des suspensions de bactériophages sont connus des instances. Pherecydes Pharma® réalise un certain nombre de contrôles, essentiellement microbiologiques sur les suspensions de bactériophages, conformément aux méthodes microbiologiques décrites à la Pharmacopée européenne (9^{ème} édition) et fournit un certificat d'analyse du lot.

Dans la mesure où il n'existe pas à ce jour de Monographie spécifiques aux bactériophages dans la Pharmacopée européenne ou française, ces contrôles ne sont donc pas spécifiques aux attributs qualité des bactériophages, mais essentiellement destinés à vérifier les exigences générales relatives à la voie d'administration choisie.

Pherecydes Pharma® produit des suspensions de bactériophages caractérisés, mises à disposition selon le statut de matières premières. Des étapes de préparation (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) ainsi qu'un contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale de bactériophages doivent donc être réalisés par le pharmacien hospitalier de la PUI afin de permettre une administration chez l'homme.

Pherecydes Pharma® réalise le phagogramme, au sein de ses locaux.

III.7.b Bactériophages de l'Hôpital Militaire de la Reine Astrid (Belgique)

Les chercheurs de l'HMRA à Bruxelles étudient les bactériophages depuis 2006. Ils ont participé à l'essai clinique multicentrique international Phagoburn® qui évaluait l'efficacité et la tolérance des bactériophages dans le traitement des plaies infectées à *E. coli* ou à *Pseudomonas aeruginosa* chez les grands brûlés.

Cette structure dispose d'une banque de bactériophages dont les origines sont diverses : Europe de l'Est, Allemagne, etc. Les bactériophages sont séquencés, caractérisés puis stockés dans leurs locaux.

Les chercheurs isolent, purifient et caractérisent des bactériophages conformément à une Monographie générale des bactériophages nationale belge validée par l'AFMPS en janvier 2018 (27–31). La Monographie présente des recommandations et points techniques à prendre en compte lors de l'isolement, la caractérisation et la purification d'un type de bactériophage. Toutes ces étapes sont réalisées au sein d'un établissement de santé, dans un environnement contrôlé (contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air) afin de limiter la contamination microbienne - particulière et la dégradation des bactériophages. L'HMRA garantit le caractère lytique des bactériophages caractérisés et réalise un certain nombre de contrôles (27–31).

A ce jour, L'HMRA produit des principes actifs de bactériophages à usage pharmaceutique (API), sous la forme de suspension ou lyophilisats, pouvant être utilisés comme des composants ou « matières premières » d'une préparation magistrale ou hospitalière.

III.7.c Bactériophages des laboratoires de recherche académique (France)

L'Institut Pasteur de Paris dispose de bactériophages actifs essentiellement sur des souches *E. coli* ou *P. aeruginosa*. Ils sont en mesure de réaliser un phagogramme au sein de leurs locaux avec les bactériophages de leur banque. La purification est réalisée selon un mode opératoire spécifique. Ils garantissent le caractère lytique des bactériophages caractérisés. Les bactériophages dont ils disposent ne peuvent être utilisés directement en clinique, des étapes de production en quantité et de contrôle des suspensions obtenues doivent être réalisées.

III.7.d Bactériophages de la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Allemagne)

La DSMZ (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires) est un centre qui appartient à l'Institut Leibniz, localisée en Allemagne. Ce centre dispose d'importantes collections de levures, bactéries, champignons et bactériophages. L'équipe de recherche réalise les étapes de caractérisation des bactériophages de leur collection. Ils garantissent le caractère lytique des bactériophages caractérisés. Ils ne prennent cependant pas en charge les étapes de production en grande quantité, purification et de contrôle de qualité pharmaceutique des suspensions de bactériophages. Ainsi, les bactériophages dont ils disposent ne peuvent être utilisés directement en clinique et il faudrait disposer d'un sous-traitant habilité à réaliser les étapes de production et de contrôle avant que ces suspensions ne puissent être utilisées en clinique.

III.7.e Bactériophages de l'Institut Eliava (Géorgie)

Cet institut situé à Tbilissi en Géorgie est entièrement dédié aux bactériophages et à ses applications thérapeutiques. En dépit de l'arrivée des antibiotiques, les Géorgiens n'ont jamais cessé de pratiquer la phagothérapie. Cependant, peu de données sur cette utilisation ont été publiées. Cet institut dispose d'une

importante collection de bactériophages qu'ils utilisent pour traiter des infections dues à des bactéries multi-résistantes. Malheureusement, nous ne disposons d'aucune donnée sur la caractérisation des bactériophages de leur phagothèque, pas plus que sur les étapes de production et le contrôle des suspensions préparées pour usage clinique.

III.7.f Bactériophage de l'Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale Ludwik Hirszfeld (Pologne)

Cet institut, autrefois Institut de microbiologie médicale, est un centre de recherche situé à Wrocław, en Pologne, fondé en 1952. Le principal fondateur est le microbiologiste et immunologiste Ludwik Hirszfeld. C'est l'un des rares centres de recherche en Europe de l'Est, avec l'Institut George Eliava, à avoir développé le domaine de la phagothérapie. Cette équipe de recherche a mis au point des méthodes pour isoler les bactériophages et pour produire des suspensions de bactériophages utilisables en clinique. L'institut dispose de sa propre unité de production ouverte en 2005. Cependant, l'utilisation thérapeutique des bactériophages au sein de cet institut est réalisée dans le cadre légal de la déclaration d'Helsinki. En effet, dans la mesure où elle n'est pas encore une thérapie approuvée, elle reste une thérapie expérimentale. Peu de données sur l'utilisation thérapeutique des bactériophages isolés et amplifiés par cet institut ont été publiées. Malheureusement, nous ne disposons également d'aucune donnée sur la caractérisation des bactériophages, les étapes de production et le contrôle de la qualité pharmaceutique des suspensions qui sont utilisées dans cet institut.

III.7.g Bactériophages de la société AmpliPhi Biosciences Corporation® (États-Unis)

Il s'agit d'une société de biotechnologie dont les principaux axes de recherche et de développement sont la mise au point de solution thérapeutique à base de bactériophages et de peptides pour le traitement des infections bactériennes multirésistantes. Le site de production se situe en Slovaquie. Un certain nombre de cocktails de bactériophages produits par AmpliPhi® ont été autorisés pour un usage compassionnel en Australie et aux États-Unis (49–53). Toutefois comme pour les autres centres présentés plus haut, nous ne disposons d'aucune donnée sur la qualification des bactériophages contenus dans la phagothèque, ni sur le procédé de production des suspensions à usage clinique, ni sur les procédures et critères de contrôle qualité.

IV Les modalités de l'accès à la phagothérapie en France

IV.1 Les situations cliniques potentiellement éligibles à un traitement par bactériophages

La décision de débiter un traitement par bactériophages doit être prise par une équipe hospitalière pluridisciplinaire : médecin hospitalier, pharmacien hospitalier ainsi qu'avec un infectiologue référent dans le domaine et si besoin un chirurgien. Chacun des paramètres tels que la voie d'abord, la posologie, les dispositifs médicaux (DM) utilisés doivent être discutés en amont en réunion de concertation pluridisciplinaire, afin d'optimiser l'efficacité du traitement et de sécuriser l'administration.

Compte tenu des interrogations croissantes sur les bactériophages émanant de la communauté scientifique, médicale et des patients, l'ANSM a souhaité élaborer lors du CSST du 24/03/2016 une position quant aux situations cliniques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages (17).

Un consensus de critères justifiant une situation de besoin applicable à tout type d'infection pour un accès précoce aux bactériophages a été défini :

- un pronostic vital engagé ou un pronostic fonctionnel menacé ;
- une situation d'impasse thérapeutique (c'est-à-dire en « situation de sauvetage ») ;
- une infection monomicrobienne.

Par ailleurs, au regard des données à ce jour limitées permettant de sous-tendre l'utilisation des bactériophages, il a été acquis :

- la nécessité d'une collégialité sur la démarche thérapeutique avec l'équipe clinique, l'ANSM pouvant être assistée d'experts ponctuels ;
- la nécessité de disposer des résultats d'un phagogramme, ayant identifié un bactériophage compatible avec l'infection à traiter, avant la décision d'une mise sous traitement (imposant la réalisation d'un phagogramme dans des délais rapides). Le cas où le phagogramme, qui testera les différents bactériophages « disponibles » pour envisager une production d'une suspension de bactériophages pertinents, révélerait qu'aucun bactériophage des phagothèques analysées n'est pertinent, imposera alors le recours à une première étape d'identification et sélection d'une nouvelle souche de bactériophages.

Les critères définis par le CSST décrivent la situation clinique idéale. Cependant, l'expérience clinique sur les bactériophages, acquise au cours de ces 2 dernières années, la disponibilité limitée des cocktails de bactériophages et les incertitudes sur cette thérapeutique sont 3 facteurs qui ont participé à l'évolution de

certaines de ces critères. Ainsi, des cas pratiques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages ont été définis :

- **Une résistance bactérienne aux antibiotiques** : une infection plurimicrobienne avec par exemple une souche toto-résistante et une souche sensible à un traitement par antibiotiques.
La notion d'infection mono-microbienne est donc à pondérer. Dans certains cas, l'infection peut être polymicrobienne, mais une seule bactérie va être ciblée par la suspension de bactériophages car elle est la cause de la morbidité infectieuse. Les autres bactéries présentes au niveau du foyer infectieux seront couvertes par une antibiothérapie adaptée. A titre d'illustration, dans les infections ostéo-articulaires, les infections polymicrobiennes correspondent à environ 10% des infections sur prothèses ;
- Une infection dont le germe reste sensible à certains antibiotiques mais dont la **morbidité liée au traitement** (aggravation de la fonction rénale, allergie, etc.) devient inacceptable ;
- **Une inefficacité clinique** : infection difficile à éradiquer avec un passage à la chronicité. C'est le cas par exemple des infections osseuses, où les germes peuvent être sensibles aux antibiotiques. Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'antibiotique jouent un rôle primordial dans l'éradication des bactéries. Cependant, dans certaines situations, il est difficile d'atteindre les concentrations efficaces en raison par exemple d'une faible diffusion de l'antibiotique au niveau du site d'intérêt. De plus, les bactéries peuvent produire un biofilm (sur le matériel orthopédique notamment) afin de se protéger de l'environnement. Elles deviennent alors inaccessibles aux antibiotiques et échappent au système immunitaire de l'hôte. De façon intéressante, certains bactériophages ont la capacité d'hydrolyser les polysaccharides bactériens qui composent les biofilms (54–56).

IV.2 Information de l'ANSM quant au projet d'utilisation thérapeutique des bactériophages

Le médecin hospitalier en charge du patient ainsi que le pharmacien hospitalier **doivent informer l'ANSM de leur intention d'administrer une suspension de bactériophages à un patient.** L'équipe médicale doit présenter le cas en détaillant :

- **l'histoire détaillée de la maladie**
- **l'historique détaillé et exhaustif des traitements antibiotiques,**
- **l'identification du/des germe(s) avec l'antibiogramme,**
- **la voie d'administration et la posologie envisagée de la suspension bactériophages,**
- **les conditions de manipulation des suspensions de bactériophages** : la manipulation des suspensions-lyophilisats de bactériophages (dilution, préparation de seringues...) doit être réalisée au sein d'un environnement contrôlé : contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air.

En effet, il est nécessaire d'évaluer la pertinence de la demande de bactériophages au regard des données cliniques et des données de la littérature avant de réaliser le phagogramme. L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans ce processus d'évaluation avec une possible sollicitation d'experts ponctuels externes.

Contacts : Direction Produits en charge des vaccins, des médicaments anti-infectieux, en hépatogastroentérologie, en dermatologie, de thérapie génique et des maladies métaboliques rares (INFHEP), pôle MALINF.

Organigramme pôle INFHEP : [https://www.ansm.sante.fr/Les-contacts-utiles-a-l-ANSM - VACCIN](https://www.ansm.sante.fr/Les-contacts-utiles-a-l-ANSM-VACCIN)

Responsable : Nathalie.MORGENSZTEJN@ansm.sante.fr

IV.3 Détermination de la sensibilité des souches bactériennes aux bactériophages et de l'efficacité à former des plages de lyse

IV.3.a Le phagogramme

De la même manière que sont réalisés les antibiogrammes pour sélectionner les antibiotiques actifs sur la bactérie responsable de l'infection, il est possible et nécessaire de réaliser un **phagogramme**. Les bactériophages étant spécifiques d'une espèce bactérienne, voire seulement de quelques souches de cette espèce, le principal risque lié à une administration d'un bactériophage sans avoir vérifié son activité via un phagogramme est l'absence d'efficacité.

Le phagogramme a pour objectif de tester **la sensibilité de la souche bactérienne** vis-à-vis d'un ou de plusieurs bactériophages candidats qui sont détenus dans une phagothèque. Il démontre *in vitro* que certains bactériophages présentent un effet bactéricide sur la souche bactérienne. L'analyse des résultats de ce test permet d'identifier et de sélectionner des bactériophages spécifiquement actifs contre la bactérie incriminée afin de mettre au point, si jugé utile, un cocktail thérapeutique « sur mesure » de plusieurs bactériophages différents. L'utilisation simultanée de plusieurs bactériophages sur une unique souche bactérienne peut être à l'origine d'un phénomène de potentialisation (synergie d'action) et d'une réduction du risque d'apparition de résistance (2).

La réalisation du phagogramme est relativement similaire à celle d'un antibiogramme (technique des « sur-spots ») : une culture bactérienne de la souche d'intérêt (isolat clinique du patient) est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu nutritif solide. Une fois la surface sèche, quelques microlitres de différentes suspensions de bactériophages (1 à 2 µL) sont déposés. Les résultats sont lus après une incubation (4 à 12 heures à 37 °C). L'activité d'un bactériophage sur les bactéries sensibles conduit à une lyse de ces dernières, caractérisée par l'apparition des « plages » de lyse (plage claire sur le milieu de culture) à l'endroit où la

goutte de bactériophage a été déposée (**Figure 3.**). La présence d'une plage de lyse témoigne donc de la sensibilité de la souche bactérienne au bactériophage testé (57,58).

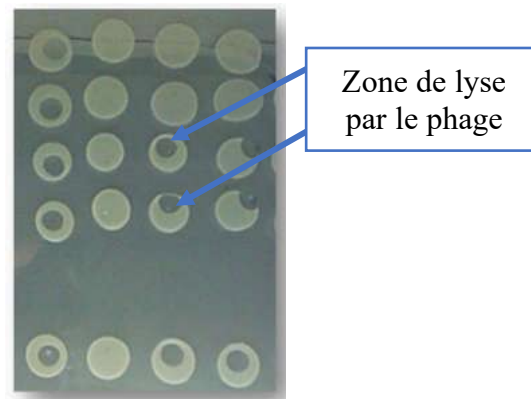


Figure 3. Aspect de la technique des « sur-spots », un même bactériophage est testé sur 20 souches bactériennes différentes (2)

Le phagogramme permet d'identifier grossièrement les bactériophages actifs sur une souche bactérienne donnée. Il donne une première idée de l'efficacité des bactériophages disponibles sur la souche bactérienne. Cependant, constater sur le phagogramme une lyse bactérienne n'est pas suffisant pour attester et encore moins quantifier l'efficacité du/des bactériophage(s). Il ne peut être utilisé seul pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes aux bactériophages (58).

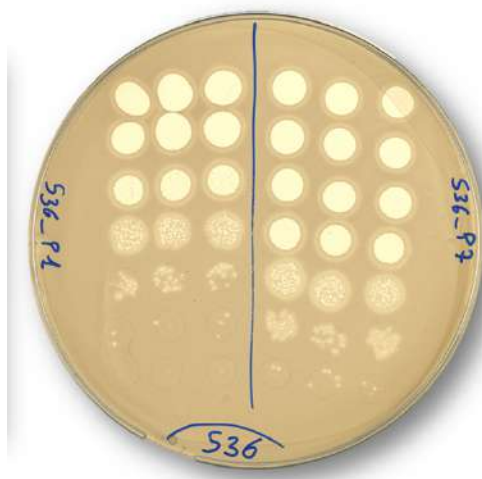
Il est donc nécessaire de réaliser ensuite **une titration et une étude de la cinétique de lyse.**

IV.3.b Titration et cinétique de lyse

L'étape de titration permet :

- de mettre en évidence des plages de lyse individualisées, seuls témoins de la présence d'un cycle infectieux viral chez les bactéries ;
- de définir la concentration de bactériophages actifs à l'origine d'une lyse bactérienne, soit le nombre de bactériophages actifs contenus dans la suspension, en Plaque-Forming Units (PFU)/mL.

Lors de la titration, différentes dilutions (facteur 10) d'une suspension contenant un clone de bactériophages à titrer sont réalisées et testées sur la souche bactérienne hôte d'intérêt (**Figure 4.**). Cette technique permet la visualisation de plages de lyse individualisées à différentes concentrations de bactériophages. Le titre est déduit du nombre de plages de lyse (PFU/mL), chaque bactériophage donnant potentiellement une plage de lyse.



Chaque solution de bactériophage a été diluée de façon sériée d'un facteur 10, de haut en bas (10^{-1} à 10^{-7}) et 4 μ L de chaque dilution ont été déposés en triplicat sur une gélose préalablement recouverte de la souche 536 à tester.

En comptant les plages de lyse individuellement observées aux dilutions les plus importantes, il est ainsi possible de déterminer le nombre de particules virales infectantes par mL de solution (PFU/mL).

Figure 4. Exemple de titration de 2 solutions de bactériophage 536-P1 et 536-P7, sur la souche *E. coli* 536. Des dilutions en série de 2 bactériophages (536-P1 et 536-P7) ont été déposées sur la souche 536 (2).

Différentes méthodes existent pour déterminer le titre de la suspension de bactériophages :

- Double agar overlay method (59) ;
- Direct plating plaque assay (60) ;
- Small drop plaque assay system (61).

La titration permet de calculer l'**efficiency of plaquing (EOP)** (57,58). Il s'agit de l'efficacité des bactériophages à former des plages de lyse en milieu gélosé, autrement dit l'efficacité des bactériophages à lyser les bactéries. L'EOP est basée sur la comparaison de l'activité d'une suspension de bactériophages sur la souche du patient *versus* celle qui a permis d'isoler le bactériophage (souche-hôte). Elle est obtenue en titrant une suspension d'un bactériophage X :

- sur une bactérie A d'intérêt, par exemple la souche responsable de l'infection ;
- sur la bactérie B de référence : l'hôte primaire du bactériophage c'est-à-dire celui ayant permis d'isoler le bactériophage (57,58).

Des dilutions successives de la suspension de bactériophages sont étalées d'une part sur une boîte contenant une culture bactérienne de la souche du patient et d'autre part sur une boîte contenant l'hôte primaire. Après incubation de plusieurs heures à 37 °C, il est alors possible de visualiser pour une dilution donnée le nombre de particules virales et d'en déduire la concentration de particules virales actives dans la suspension (57,58). La concentration de bactériophage obtenue sur la souche du patient, c'est-à-dire le titre, peut être inférieure à celle obtenue sur la souche-hôte. C'est le reflet d'une efficacité moindre du bactériophage à détruire la souche du patient par rapport à la souche-hôte.

L'EOP est ainsi le rapport de ces deux concentrations :

EOP = titre sur A / titre sur B.

M. Khan Mirzaei et A. S. Nilsson ont défini des intervalles selon les valeurs de l'EOP :

- valeur **supérieure ou égale à 0.5** : efficacité **importante** à former des plages de lyse ;
- valeur **comprise entre 0.1 et 0.5** : efficacité **moyenne** à former des plages de lyse ;
- valeur **comprise entre 0.001 and 0.1**, efficacité **faible** à former des plages de lyse : le bactériophage risque d'être peu efficace ;
- valeur **inférieure ou égale à 0.001** : efficacité **insuffisante** : le bactériophage risque d'être inefficace (58).

L'étude de la cinétique de lyse permet d'évaluer l'activité du/des bactériophage(s) en milieu liquide (**Figure 5**) (2). Une culture bactérienne est mélangée avec une suspension de bactériophages. Une lecture de la densité optique est réalisée à différents temps. Par suivi de la turbidité du milieu, il est possible de confirmer l'absence de croissance bactérienne.

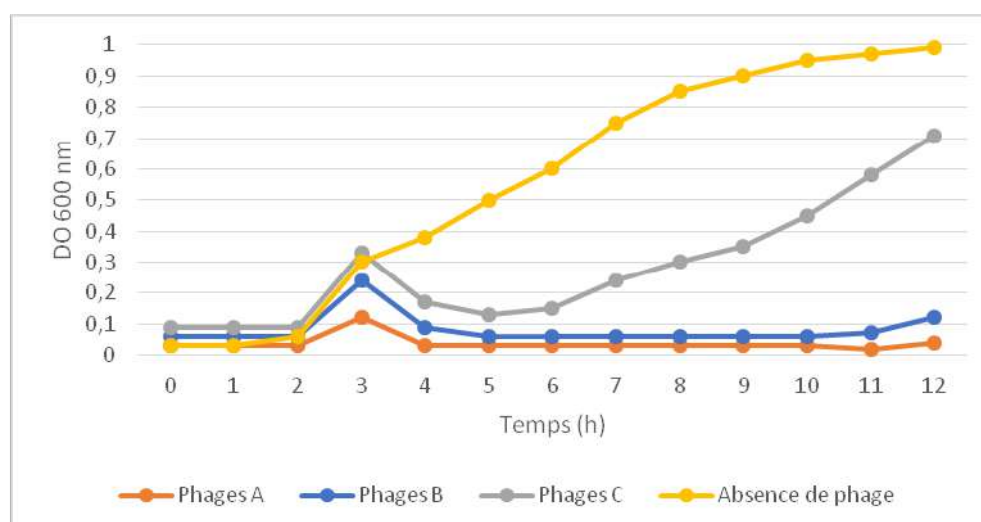


Figure 5. Cinétique de lyse d'une souche X par les bactériophages A, B et C.

Les bactériophages A et B sont efficaces sur la souche bactérienne d'intérêt, ils sont à l'origine d'une lyse bactérienne, comme en témoigne l'absence d'augmentation de la turbidité du milieu après une phase initiale de croissance bactérienne à H3. Le bactériophage C n'est que transitoirement actif et ne réussit pas à enrayer la croissance bactérienne de façon prolongée.

La réalisation du phagogramme, ainsi que la détermination des paramètres tels que le titre de la préparation et l'EOP, constituent des étapes préalables à l'administration des bactériophages. Lors de la réunion du CSST dédié à la phagothérapie créé le 24/03/2016 par l'ANSM, il a été admis, au regard des données limitées à ce jour, la nécessité de disposer des résultats du phagogramme avant la décision

d'une mise sous traitement (17). L'efficacité présumée d'une phagothérapie préalablement à son administration doit ainsi prendre impérativement en compte l'activité du ou des bactériophages sur les souches bactériennes isolées chez le sujet.

Ces tests peuvent être réalisés par les sociétés commercialisant les bactériophages. Pour ce faire, il est nécessaire d'envoyer la souche du patient en respectant les conditions de transport (cf. V.1). Dans le cas où le laboratoire commercialisant les préparations de bactériophages n'effectue pas le phagogramme, il est possible de le réaliser au sein du laboratoire de microbiologie. Cependant, une telle réalisation nécessite un espace dédié et une formation rigoureuse du personnel. En effet, la réalisation du phagogramme (étapes de dilution, pipetage, normalisation de la densité bactérienne au départ, etc.) ainsi que la lecture des résultats (analyse des plages de lyse) doivent être réalisées par une personne expérimentée afin d'augmenter la sensibilité du test et de limiter les biais d'interprétation et le risque d'erreurs.

IV.4 Évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières de bactériophages et les étapes de préparation – contrôle de la qualité pharmaceutique des préparations terminées

IV.4.a Évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières de bactériophages

Il convient de rappeler que les contrôles principaux sur la qualité pharmaceutique des matières premières - substances actives de bactériophages devront être réalisés par le fabricant-industriel-développeur, conformément à la réglementation en vigueur qui impose à tout fournisseur d'apporter un bulletin de contrôle de la matière première qu'il fournit. Le pharmacien de la PUI devra analyser de façon critique ce bulletin de contrôle pour définir s'il peut engager sa responsabilité quant à l'utilisation chez l'Homme de cette matière première-substance active.

Selon des textes spécifiques relatifs aux principes actifs de bactériophages, soient les suspensions-lyophilisats, tels que la Monographie générale belge sur les bactériophages, et des textes généraux tels que la Monographie générale de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition : « Substances pour usage pharmaceutique » (2034) et les autres textes existants, une liste des exigences relatives à la production et aux contrôles qualité des matières premières de bactériophages a été définie (27,28,31,32,38–40).

Pour les contrôles réalisés sur la matière première-substance active, les éléments suivants devront être détaillés : les référentiels utilisés (exemple Pharmacopée européenne, monographie nationale), les méthodes analytiques, les critères d'acceptation. Ces contrôles devront être réalisés au sein d'un environnement parfaitement maîtrisé en termes de contamination microbienne, particulaire et pyrogène (zone à atmosphère contrôlée, ZAC...), conformément à la réglementation en vigueur (Pharmacopée européenne, BPF...).

Les informations et contrôles listés ci-dessous sont indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières - substances actives et devraient être détaillées sur le bulletin de contrôle :

- **les référentiels utilisés pour la caractérisation de la bactérie utilisée pour l'isolement du bactériophage** : la directive européenne relative aux tissus et cellules (EUTCD) (33–35), les guidelines CHMP/ICH/294/95 Q5D (36), le texte de la Food and Drug Administration (FDA) : « *Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications* » (37) ;
- **le référentiel de fabrication utilisé** : BPF par exemple ;
- **le détail du procédé de fabrication de la substance active-matière première** : procédé de fabrication précis avec la liste des matières premières utilisées et leurs spécifications, y compris les banques de bactériophages et de bactéries servant à la production ;
- **la caractérisation de la bactérie servant à la production** : identité, viabilité, absence de production de toxines pathogènes, génotype, pureté ;
- **la caractérisation des bactériophages** : identité (famille, sous famille, genre, espèce), caractère lytique, structure par microscopie électronique, séquençage génomique, vérification de l'absence de gènes impliqués dans le processus d'intégration virale au génome bactérien, liste des bactéries sensibles aux bactériophages.

Comme précisé aux chapitres précédents, il est ainsi impératif d'utiliser en thérapeutique des bactériophages lytiques caractérisés, et de vérifier par ailleurs l'absence de bactériophages tempérés dans la suspension-lyophilisat produit par le fabricant (28,44). Des investigations doivent être menées par le biais notamment d'analyses du génome par séquençage de l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la suspension-lyophilisat (matière première) afin de limiter le risque lié à la présence de bactériophages tempérés, potentiellement et indirectement pathogènes pour l'homme.

Il faut noter que l'administration de bactériophages dont la caractérisation est incomplète (devant la persistance d'inconnues concernant certains gènes d'antibiorésistance ou codant pour des toxines bactériennes) peut être à l'origine de transfert de facteurs de virulence aux souches bactériennes responsables de l'infection.

Une comparaison du génome du bactériophage isolé avec celui d'un homologue proche identifié ainsi que la recherche de gènes codant pour des intégrases, transposases ou recombinases, des gènes de virulences doivent être réalisées (29,39).

Ces résultats permettront de renseigner et confirmer :

- l'identité du bactériophage ;
- le caractère lytique de ce dernier ;

- l'absence de possibilité d'intégration du génome du bactériophage dans le génome bactérien.

D'autres méthodes permettent de confirmer l'absence de bactériophages tempérés : « *prophage induction method* », comme le test à la mitomycine C ou l'irradiation par ultraviolet (UV) (31,62,63). Il est également nécessaire de vérifier l'absence de gènes codant pour des toxines bactériennes (la toxine du syndrome de choc toxique, la toxine exfoliative et la leucocidine de Pantone-Valentine par exemple si on s'intéresse aux phages ciblant *Staphylococcus*) ou des gènes de résistance aux antibiotiques ;

- **la pureté de la matière première-substance active** : les impuretés provenant du procédé de fabrication doivent être réduites au maximum : ADN bactérien, débris bactériens, protéines bactériennes, additifs du processus de fabrication, solvants... Pour certaines impuretés, les concentrations maximales résiduelles tolérées sont définies, comme par exemple :
 - Selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur les biothérapies, la concentration en ADN résiduel issu de la cellule hôte doit être inférieure à 10 ng/dose. Par analogie, cette concentration paraît acceptable comme valeur maximale tolérée en ADN bactérien résiduel (40).
 - Certains additifs sont déjà utilisés comme excipients pour la formulation de médicaments ayant une AMM et dont nous connaissons le profil de tolérance. Ainsi, il suffit de vérifier la concentration maximale tolérée de cette molécule dans un médicament et de la comparer à celle présente dans les préparations de bactériophages.
- **la concentration en endotoxines de la matière première-substance active** : la limite en endotoxines est fonction de la posologie, de la voie d'administration et de la masse corporelle du patient. Dans la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition, deux parties traitent des endotoxines bactériennes : la Monographie 2.6.14 « Endotoxines bactériennes » et le chapitre général 5.1.10. « Recommandations pour la réalisation de l'essai des endotoxines bactériennes ». Pour certaines voies d'administration, la limite maximale en endotoxines autorisée est spécifiée. Par exemple, la Ph. Eur. exige un contrôle des endotoxines bactériennes pour les préparations parentérales par voie IV avec une limite de 5 UI (Unités Internationales)/kg (poids corporel du patient)/h (si perfusion > 1 heure) ;
- **la stérilité de la matière première-substance active** (non exigée) : **test de stérilité**. La Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définit le mode opératoire. La réalisation, à la réception des préparations de bactériophages, d'une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à 0,22 µm et un SteritestTM peut être envisagée.
- **dans le cas d'une matière première-substance active non stérile : contrôle microbiologique**. Les Monographies 2.6.12 et 2.6.13 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définissent le mode opératoire de ce contrôle. Il s'agit de l'essai de dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT)

et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Les critères d'acceptation en fonction des voies d'administration sont décrits dans le chapitre général 5.1.4 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition. Dans le cas de substances actives non stériles pour usage pharmaceutique les critères d'acceptation de la qualité microbiologiques sont :

- DGAT 10^3 Unité formant colonie (UFC)/g ou UFC/mL
- DMLT 10^2 UFC/g ou UFC/mL ;
- **le titre de la matière première-substance active** : la détermination de ce titre doit être réalisée selon une procédure standardisée (cf. IV.3.b) ;
- **les données de stabilité de la matière première-substance active** ;
- **le volume extractible de la matière première-substance active** ;
- **le conditionnement de la matière première-substance active** ;
- **le pH de la matière première-substance active** : proche de la neutralité pH (6.0 à 8.0).

Il convient de rappeler, qu'il est de la responsabilité du fabricant de réaliser les tests énumérés ci-dessus sur la substance qu'il met à disposition. Le pharmacien hospitalier contrôle ensuite les informations présentes dans le dossier qualité.

Il est possible que certaines de ces informations ne soient pas fournies par le fabricant, ou soient données de manière incomplète ou avec un degré d'incertitude. **Dans ce contexte, chacune de ces informations doit être évaluée selon :**

- **la voie d'administration choisie,**
- **la posologie,**
- **la formulation,**
- **la situation du patient en tenant compte du rapport bénéfice/risque estimé.**

Si nécessaire, le pharmacien hospitalier demandera des informations complémentaires aux fabricants, comme par exemple la concentration résiduelle en impuretés, des données supplémentaires sur la caractérisation de bactériophages.

Le pharmacien pourra également solliciter des experts externes pour une évaluation collégiale de la qualité pharmaceutique de la matière première. En effet, alors que certains tests, tels que la définition du pH, de la concentration en endotoxines, ou la filtration stérilisante, peuvent être aisément réalisés au sein d'une PUI, il n'est pas du ressort du pharmacien de séquencer l'ADN-ARN des bactériophages présents dans la matière première afin de s'assurer de l'absence de bactériophages tempérés. L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus d'évaluation de la qualité des suspensions-lyophilisats de bactériophages (cf. Contacts ANSM, page 25)

Dans le cas de substances actives ou de préparations de bactériophages fabriquées par l'HMRA : il s'agit d'une production réalisée au sein d'un établissement de santé conformément à une Monographie générale des bactériophages nationale belge. Ainsi l'évaluation de la qualité pharmaceutique sera réalisée à l'aide des données du certificat d'analyse du lot fourni par HMRA

L'Annexe 3 et l'Annexe 4 résument les modalités de contrôle des MPUP selon le circuit d'approvisionnement.

IV.4.b La préparation et le contrôle de la qualité pharmaceutique

Après avoir validé la qualité pharmaceutique de la matière première grâce au bulletin de contrôle fourni par le fabricant (cf. infra), **le pharmacien hospitalier doit réaliser des étapes de préparation** (reconstitution, formulation galénique adaptée à la voie d'administration) conformément aux BPP au sein de la PUI, ainsi qu'un **contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation magistrale (ou hospitalière) de bactériophages préparée**, afin de permettre une administration chez l'homme.

◇ La préparation : optimisation-définition de la formulation galénique, mise en forme pharmaceutique

Le pharmacien a la responsabilité de la décision de la réalisation des préparations (19). Une évaluation de la valeur ajoutée et de la faisabilité technique de la préparation est réalisée par le pharmacien de la PUI.

La valeur ajoutée est estimée en considérant pour chaque préparation notamment :

- l'intérêt pharmaco-thérapeutique ;
- la meilleure acceptabilité possible pour une observance renforcée ;
- l'appréciation du bénéfice/risque.

La faisabilité technique est estimée en considérant pour chaque préparation :

- la présence des procédures générales et de modes opératoires ;
- la présence de matériel et locaux conformes à la réalisation de la forme pharmaceutique ;
- la présence d'un personnel formé une analyse de la formule de la préparation (19).

L'étape de **préparation au sens pharmaceutique du terme**, c'est-à-dire la **mise en forme pharmaceutique, la reconstitution, la dilution, à partir des matières premières de bactériophages produites en quantité suffisante par un fabricant**, doit donc être **réalisée au sein d'une PUI**, sous la responsabilité d'un pharmacien, en respectant les BPP (19). Des mesures particulières de protection de l'environnement et des personnes doivent être appliquées (cf. V.2.b).

Les étapes de préparation peuvent comporter :

- **l'optimisation de la formule** afin d'**assurer une meilleure biodisponibilité** ;
- **la mise en forme pharmaceutique** (dilution, reconstitution, mélange de plusieurs suspensions de bactériophages, préparation en seringues, poches) **afin de « faciliter » l'administration** de la suspension de bactériophages (28,31,64–70).

Dans ce cas, le pharmacien réalise une préparation magistrale (ou hospitalière) de bactériophages à partir de matières premières (suspensions-lyophilisats) produites par un fabricant-développeur.

La formulation d'une préparation est fondamentale. Elle permet de définir les **caractéristiques physico-chimiques et galéniques** d'une préparation au regard de la voie d'administration choisie, dans le but d'optimiser les paramètres pharmacocinétiques d'une substance, tout en garantissant l'efficacité et la sécurité du traitement. Au vu des caractéristiques pharmacocinétiques des bactériophages, un des objectifs de la formulation est **d'assurer la meilleure biodisponibilité** de ces derniers au site infectieux afin de permettre l'amplification virale.

La stabilité de la préparation doit également être maîtrisée. La voie d'administration doit donc permettre de concentrer les bactériophages au niveau du site infecté tout en restant compatible avec les caractéristiques pharmaceutiques des cocktails de bactériophages.

Ainsi, l'administration locale de bactériophages pourrait être considérée comme la plus sécuritaire selon les données disponibles avec l'avantage de connaître la quantité de bactériophages délivrée au site de l'infection. Cependant, une telle voie d'administration ne peut pas constituer une réponse au traitement d'infections systémiques pour lesquelles la voie intraveineuse (IV) ou orale pourrait être envisagée. Mais la quantité de bactériophages délivrée au niveau systémique après administration par voie orale ou à travers les muqueuses reste incertaine.

De même, le volume de distribution des bactériophages étant méconnu, l'administration par voie IV serait une approche permettant de connaître directement la quantité de bactériophages délivrée dans la circulation sanguine, mais sans toutefois connaître la quantité de bactériophages au site de l'infection.

Lors du CSST du 21 mars 2019, il a été admis par l'ensemble des experts que la voie orale était exclue. En effet, il est difficile de prédire un niveau d'activité suffisant sur la cible bactérienne via cette voie d'administration qui implique une absorption intestinale avec possible perte/dégradation. Il a également été admis que la voie intrathécale devait être exclue *a priori*, mais pourrait être à considérer sous réserve de garanties suffisantes sur la qualité (notamment microbiologiques et apyrogénicité) des préparations de bactériophages (13).

Différents risques sont à considérer lors des étapes de préparation - administration de la suspension de bactériophages :

- le risque d'adsorption au niveau du matériel de préparation et des DM utilisés pour la préparation et l'administration des bactériophages ;

- le risque de dégradation des bactériophages au niveau du site d'administration, au cours de l'administration, ce risque étant spécifique de la voie d'administration ;
- la problématique d'inactivation des bactériophages par l'acidité gastrique en cas d'administration par voie orale ;
- la sensibilité au pH, à la température ;
- la concentration en endotoxines, la stérilité de la préparation (3,9,27)...

Les bactériophages sont des virus, par conséquent ils sont sensibles à la température, aux conditions acides (pH = 4 et inférieur) et basiques (pH = 11 et supérieur) (44).

Ainsi, l'équipe hospitalière déterminera la voie d'administration, la composition de la solution en principe actif et excipients (titre/concentration...), la forme galénique ainsi que les DM utilisés lors de l'administration (en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques et techniques des DM). A noter, que la dose de bactériophages à administrer dépendra de la voie d'administration envisagée et de l'inoculum bactérien.

A titre d'exemple, dans le cas d'une nébulisation de suspension de bactériophages, il faut considérer (64–66) :

- le système de nébulisation : nébuliseur pneumatique, nébuliseur à plaques vibrantes (il est recommandé d'éviter les nébuliseurs ultrasoniques et d'utiliser préférentiellement les nébuliseurs à plaques vibrantes pour lesquels le recul en matière de tolérance (pour les bactériophages) semble être le plus positif) ;
- le circuit de nébulisation : l'interface avec le patient c'est-à-dire le type d'embout, les caractéristiques physico-chimiques et techniques de la tubulure soit les matériaux, la longueur, le diamètre ;
- la taille des gouttelettes nébulisées ;
- le rendement du titre de bactériophages à la sortie du nébuliseur ;
- la durée de la nébulisation au regard des données de stabilité de la suspension de bactériophages ;
- l'ajout d'excipient(s) : il est recommandé d'ajouter des tensio-actifs dans la préparation pour nébulisation.

◇ **Contrôle de la qualité pharmaceutique des préparations terminées de bactériophages produites par la PUI**

L'évaluation de la qualité pharmaceutique des préparations pharmaceutiques terminées de bactériophages (préparations magistrales ou hospitalière) est un prérequis indispensable à l'administration. En effet, le pharmacien doit s'assurer que les différentes étapes de préparation, ainsi que l'étape d'administration, ne sont pas à l'origine d'une dégradation – altération de la

substance active telle qu'une diminution du titre, une inactivation des bactériophages, ou toutes autres altérations de la qualité pharmaceutique (II.4.1). De plus, il doit démontrer que le développement de la forme pharmaceutique est conforme à l'indication (dose...).

Selon les données de la littérature relatives aux préparations de bactériophages et notamment de l'équipe l'HMRA, une liste de contrôles qualité devant être réalisés sur les préparations (magistrales ou hospitalières) de bactériophages préparées par la PUI a été définie (30,31,39). Pour chaque contrôle, les éléments suivants devront être détaillés : les référentiels utilisés (exemple Pharmacopée européenne, monographie nationale), les méthodes analytiques, les critères d'acceptation. Ces contrôles devront être réalisés au sein d'un environnement parfaitement maîtrisé en termes de contamination microbienne, particulière et pyrogène (zone à atmosphère contrôlée, ZAC...), conformément à la réglementation en vigueur (Pharmacopée européenne, BPP...).

Les informations et contrôles listés ci-dessous sont indispensables à l'évaluation de la qualité pharmaceutique des préparations terminées de bactériophages préparées par la PUI :

- **le titre de la préparation.** De manière empirique, il est admis que le titre d'une préparation de bactériophages doit être au moins égal à 10^8 - 10^9 PFU/ml (71). La détermination de ce titre doit être réalisée selon une procédure standardisée (cf. IV.3.b) ;
- **la MOI (multiplicity of infection)**, rapport du nombre de bactériophages sur le nombre de bactéries mis en présence, est un des paramètres qui conditionne le niveau d'efficacité de l'infection virale. Or ce dernier, facilement maîtrisable *in vitro*, est très difficile à appréhender précisément *in vivo*. Il est admis de manière empirique que la MOI devrait se situer entre 10 et 0,1 (10,72) ;
- **les données de stabilité :** la stabilité du mélange si ajout d'excipient(s), stabilité dans le contenant final, lors de l'administration ;
- **selon le caractère stérile ou non de la préparation :** l'exigence relative à la stérilité de la préparation sera fonction de la voie d'administration et du produit (cf. Annexe 5) (66).
- selon la Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition la préparation devra être stérile :
 - lors notamment d'administration par voies parentérale, ophtalmique ou intra-mammaire, et certaines préparations pour inhalation ou irrigation intra-utérine,
 - lorsque le risque de passage systémique des bactériophages est majeur (par exemple : intégrité de la barrière cutanée gravement atteinte dans le cas d'une peau gravement lésée ou d'une plaie profonde).

Dans le cas d'une préparation stérile : test de stérilité. La Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définit le mode opératoire. La réalisation, à la réception

des préparations de bactériophages, d'une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à 0,22 µm et un SteritestTM peut être envisagée ;

Dans le cas d'une préparation non stérile : contrôle microbiologique des préparations non stériles. Les Monographies 2.6.12 et 2.6.13 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition définissent le mode opératoire de ce contrôle. Il s'agit de l'essai de dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) et du dénombrement des moisissures/levures totales (DMLT). Les critères d'acceptation en fonction des voies d'administration sont décrits dans le chapitre général 5.1.4 de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition.

- **le pH** : proche de la neutralité (6.0 à 8.0) ;
- **l'apparence visuelle** ;
- **le volume extractible** ;
- **le conditionnement.**

Chacune de ces informations doit être évaluée selon :

- **la voie d'administration choisie ;**
- **la posologie ;**
- **la formulation ;**
- **et au regard de la situation du patient en tenant compte du rapport bénéfice/risque pouvant être prédisposé.**

L'Annexe 5 détaille les exigences relatives à la qualité pharmaceutique des préparations terminées en fonction de la voie d'administration conformément à la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition.

Le pharmacien pourra solliciter des experts externes pour une évaluation collégiale de la qualité pharmaceutique de la préparation ou externaliser certains contrôles (exemple : titration...).

L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus d'évaluation de la qualité des préparations de bactériophages (cf. Contacts page 25).

IV.5 Évaluation du projet d'administration de bactériophages thérapeutiques

Une discussion collégiale autour du cas doit être menée avec l'équipe clinique en charge du patient, et l'ANSM avec une possible sollicitation d'experts ponctuels externes. Une évaluation rigoureuse :

- du cas clinique ;
- de la voie d'administration des bactériophages et de la posologie envisagée ;
- de la qualité pharmaceutique des préparations de bactériophages disponibles doit être réalisée.

Pour ce faire l'évaluation doit s'appuyer sur les données de la littérature, l'histoire clinique et thérapeutique du patient, les données microbiologiques, les résultats du phagogramme (une fois obtenus), les données relatives à la qualité des préparations de bactériophages. L'utilisation thérapeutique des bactériophages doit être considérée au regard du rapport bénéfice/risque. Elle ne doit être envisagée que si l'utilisation des bactériophages est susceptible de présenter un bénéfice pour le patient.

Il est nécessaire de disposer du consentement libre, éclairé, formel, écrit du patient ou de la personne de confiance ou bien des titulaires de l'autorité parentale dans le cas d'un patient mineur. Les bénéfices escomptés et les risques prévisibles doivent être expliqués de façon claire et loyale au patient et/ou à la famille.

IV.6 Association thérapeutique bactériophages - antibiotiques

A ce jour, l'utilisation des bactériophages est empirique, aucune étude menée selon les standards de qualité méthodologique requis, n'a démontré l'efficacité des bactériophages utilisés seuls dans le traitement des infections bactériennes.

Lors de leur utilisation thérapeutique, les bactériophages doivent venir en support de l'action des antibiotiques. Il est donc indispensable d'associer des antibiotiques lors de l'administration de bactériophages (poursuite de l'antibiothérapie initiée antérieurement) lorsque cela présente un intérêt ou une efficacité, même jugée minimale en cas d'antibiorésistance.

Il apparaît qu'à côté de la lyse bactérienne provoquée directement par les bactériophages, ceux-ci pourraient aussi contribuer à une meilleure efficacité des antibiotiques. Dans la littérature, des études ont mis en évidence une synergie entre bactériophages et antibiotiques (29,54,73).

Enfin, en raison du spectre d'action étroit des bactériophages, les autres espèces présentes au niveau du foyer infectieux doivent être couvertes par une antibiothérapie adaptée le cas échéant.

Il demeure aujourd'hui que la place des bactériophages par rapport aux antibiotiques n'a pas été définie.

La stratégie d'utilisation des bactériophages selon les indications reste à valider :

- en complément de l'antibiothérapie ? d'une chirurgie ?
- selon une utilisation isolée de bactériophages dans le cas notamment d'infections dues à des bactéries multi-résistantes ?

V Les modalités pratiques d'utilisation des bactériophages

V.1 Le transport et le stockage des différentes formes de bactériophages

Comme indiqué précédemment (cf. III.6.c), les bactériophages thérapeutiques appartiennent au groupe 1 de la classification des agents biologiques (28,44). Ainsi lors de leur transport, il n'est pas nécessaire de prescrire les règles de transport appliquées aux produits biologiques dangereux (c'est-à-dire celles appliquées aux produits biologiques classés 2814, 2900 et 3373) (48).

Le transport des bactériophages doit être sécurisé et conforme :

- soit aux Bonnes Pratiques de distribution des substances actives des médicaments à usage humain pour les matières premières unitaires produites par le fabricant ;
- soit aux Bonnes Pratiques de distribution en gros des médicaments à usage humain pour les préparations pharmaceutiques, magistrales ou hospitalières, préparées par une PUI.

A titre indicatif, les suspensions de bactériophages se conservent entre 2-8 °C (74,75). Un suivi des températures pendant le transport à l'aide d'une sonde est indispensable pour garantir la qualité des suspensions. Le transporteur doit être en mesure de fournir la traçabilité du suivi des températures.

Les suspensions de bactériophages (matières premières-préparations magistrales) pourront donc être stockées dans la zone réfrigérée de la PUI, sans mesure spécifique de protection de l'environnement supplémentaire.

V.2 Les modalités de manipulation des bactériophages

La manipulation des suspensions-lyophilisats de bactériophages, lors des étapes de préparation - reconstitution pharmaceutique en PUI ou lors de la réalisation du phagogramme, doit être réalisée au sein d'un environnement contrôlé : contrôle de la qualité microbiologique et particulière de l'air. Les locaux et le matériel doivent être conçus et entretenus de façon à convenir au mieux aux opérations à effectuer et doivent permettre de minimiser tous les risques potentiels pour l'environnement et les personnes.

La manipulation des bactériophages est couverte par la directive européenne 2000/54/CE du Parlement Européen et du conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (76).

V.2.a Le phagogramme

Les conditions de réalisation du phagogramme sont fonction de la **virulence de la bactérie utilisée pour isoler le bactériophage d'intérêt** (utilisé comme témoin positif) et de **celle de la souche bactérienne (isolat du patient) à tester**. Il s'agit dans l'immense majorité des cas de pathogènes de classe 2.

La **réalisation du phagogramme** doit avoir lieu, en conditions stériles, au sein d'**un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II**. Il est recommandé d'utiliser des cônes avec filtres pour éviter la contamination des micropipettes.

Les membres du CSST du 21 mars 2019 ont insisté sur l'importance de pratiquer systématiquement le phagogramme, avec le calcul de l'EOP et la réalisation de cinétique de lyse bactérienne. Il a été évoqué l'intérêt de tester plusieurs isolats (d'une même espèce bactérienne) d'un ou de prélèvements peropératoires pour rechercher s'il existe des phénotypes différents de sensibilité bactérienne aux phages, le nombre d'isolats à tester restant à déterminer (13). Cependant, il semble non utile de réaliser un calcul d'EOP sur une souche dont le phagogramme par technique du sur-spot montre une résistance, de même qu'une cinétique de lyse.

Il ne s'agit pas d'une étape réalisée sous la responsabilité pharmaceutique, elle peut être réalisée dans un laboratoire de microbiologie. Un phagogramme est réalisé sur décision médicale, par un laboratoire de biologie médicale qualifié pour ce diagnostic. Le biologiste assure la responsabilité de cet acte qui inclut le prélèvement, l'exécution de l'analyse, la validation des résultats, et si nécessaire leur confrontation avec les données cliniques et biologiques des patients.

V.2.b Les étapes de préparation

Les conditions de réalisation des étapes de préparation (optimisation de la formule, reconstitution...) **dépendent des exigences en termes de qualité pharmaceutique** du produit fini (exigences de stérilité...).

Différentes modalités de préparations sont possibles :

- une étape de reconstitution lors de la mise à disposition de lyophilisat de bactériophages ;
- la mise en forme pharmaceutique, par exemple : mélange de plusieurs suspensions dans une seringue afin d'obtenir un cocktail de plusieurs bactériophages.

Dans le cas de préparations stériles (application sur une peau gravement atteinte ou dans une cavité articulaire, préparation pour nébulisation, cf. Annexe 5), **les étapes de préparation** doivent avoir lieu au sein d'**une ZAC**, dans des enceintes spécifiques, conformément aux BPP :

- **soit un environnement clos, un isolateur,**
- **soit un PSM de type II.**

Selon les BPP, l'isolateur devra répondre aux exigences de la classe A en terme de qualité microbiologique et particulière de l'air, l'environnement immédiat sera conforme aux exigences de la classe D selon les BPP (27,28,31).

Si l'environnement n'est pas un espace clos, c'est à dire un poste à flux d'air laminaire (PSM de type II), alors l'environnement immédiat du flux doit répondre aux exigences de la classe B en terme de qualité microbiologique et particulière de l'air, selon les BPP (27,28,31).

Il existe trois principaux procédés de préparation de médicaments stériles :

- - la stérilisation terminale ;
- - la filtration stérilisante ;
- - la préparation aseptique.

Cependant, la stérilisation terminale n'est pas envisageable car elle entraînerait une destruction des bactériophages. Ainsi, si l'exigence de stérilité est requise pour le produit fini, deux procédés peuvent être envisagés lors de la préparation, selon les BPP :

- la filtration stérilisante, avec un type de filtre reconnu satisfaisant, en conformité avec les exigences de la Pharmacopée européenne 9^{ème} édition, c'est-à-dire un filtre à 0,22 µm en poly-ether-sulfone (PES), dont on choisira le modèle possédant le plus faible espace mort. De façon importante, il est à noter que les filtres en esters/acétate de cellulose ne doivent pas être utilisés puisqu'il s'agit de filtres sur lesquels s'adsorbent massivement les phages ;
- la préparation aseptique (si et seulement si, la matière de départ utilisée est déclarée stérile, avec résultats de tests à l'appui).

Les précautions d'habillement sont similaires à celles préconisées lors de la réalisation de préparations stériles (cf.

Tableau II).

Tableau II. Précautions d'habillement lors de la réalisation de préparations stériles

	Isolateur	PSM
Habillage	Tenue adaptée propre - Charlotte - Surchausses - Gants non stériles - Masque chirurgical	- Chaussures ou bottes stériles - Casaque stérile resserrée aux poignets - Gants stériles - Masque FFP2

En pratique, lors de la manipulation des bactériophages, le nettoyage et la désinfection des instruments et des surfaces peuvent être réalisés avec des détergents – désinfectants de surface biocide, tels que ceux utilisés en routine en milieu de soin, de type Surfa'safe Anios® (cf. V.3).

Les déchets sont traités via la filière de déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés (DASRI).

V.3 Les mesures d'hygiène et de protection liées à la manipulation des préparations de bactériophages

Compte tenu du caractère atypique des bactériophages, il est vivement recommandé d'informer au sein des établissements de santé : la direction, l'Equipe Opérationnelle d'hygiène (EOH) et la direction des soins infirmiers (DSI) de l'administration de bactériophages.

Les bactériophages sont des virus nus, par conséquent ils sont sensibles à la température (une température supérieure à 80 °C permet d'inactiver les bactériophages), aux conditions acides (pH = 4 et inférieur) et basiques (pH = 11 et supérieur) (44).

En pratique, lors de la manipulation des bactériophages, le nettoyage et la désinfection des instruments et des surfaces peuvent être réalisés avec des détergents - désinfectants de surface biocides classiques, tels que ceux utilisés en routine en milieu de soin, présentant les propriétés suivantes (77,78) :

- bactéricide conformément à la norme NF EN 1040, NF EN 13727
- fongicide ou levuricide conformément à la norme NF EN 1275, NF EN 13624
- sporicide conformément à la norme NF EN 14347,
- virucide conformément à la norme NF EN 14476 + A1.

Les produits actifs sur les virus sont détaillés dans la **Figure 6**.

[Tableau 1] Estimation des activités biocides des principales substances actives [5, 6]

	Bactéries		Mycobactéries	Spores	Moisissures	Levures	Virus	ATNC
	Gram +	Gram -						
Acide peracétique								
Ammonium quaternaire								
Biguanide (PHMB)			NP		NP	NP		
Ethanol								
Glutaraldéhyde					(1)	(1)		
Hypochlorite de sodium (eau de Javel)								(2)
Peroxyde d'hydrogène								

très bonne activité
 bonne activité
 activité moyenne
 aucune activité
 fixe fortement l'infectiosité
 NP : non précisé
 (1) : activité inconstante. (2) : à la concentration optimale de 2 % de chlore actif.

Figure 6. Estimation des activités biocides des principales substances (78)

Ewan M. Clark *et al.* ont démontré que l'eau de javel (0.5% [vol/vol]) entraînait une réduction du titre de bactériophages de 7-log_{10} (79).

A titre d'exemple, le produit de type Surfa'safe Anios® présente les propriétés précédemment citées conformément aux normes, il est donc actif sur les virus nus de type bactériophages. A noter que le détergent-désinfectant, Oxy'floor Anios®, actifs sur les spores de *Clostridium difficile* permet de gagner en couverture de virus nus de 1 à 2%.

Lors de la manipulation des bactériophages, un lavage des mains avec de l'eau et du savon doux est recommandé (80).

Il est également important de prendre en compte le matériel utilisé lors de l'administration au patient. Dans la mesure du possible, il est préférable d'utiliser du matériel à usage unique. Sinon, il faut se renseigner sur une possible stérilisation du matériel. Briers *et al* ont montré que l'activité des bactériophages FKZ anti-*P. aeruginosa* diminue progressivement de 100% à 0% lorsque ces derniers sont exposés à des températures allant de 25 à 90 °C pendant 60 min (81).

Les cycles conventionnels d'autoclavage par chaleur humide utilisés en routine dans les établissements de soins (cycle classique de 121 °C pendant 30 minutes ou cycle ATNC de 134 °C pendant 18 minutes) sont parfaitement efficaces pour l'inactivation des bactériophages.

V.4 Les modalités d'administration des bactériophages

En l'absence de recommandations et de données à ce jour, les précautions standard doivent être appliquées lors du soin.

Le nettoyage et/ou la désinfection de l'environnement proche du patient (table de chevet, adaptable, lit...), des surfaces fréquemment utilisées (poignées de porte, sanitaires...) ainsi que des locaux (sols, surfaces) seront réalisés selon les modalités définies au chapitre V.3 et en conformité avec les procédures locales.

V.5 Le financement des préparations de bactériophages

Selon l'article L. 5123-2 du Code de la santé publique (CSP), les ATU nominatives et ATU de cohorte sont réputées inscrites à la liste des collectivités et sont prises en charge par l'assurance maladie (82). Lorsque la mise à disposition des bactériophages est réalisée dans le cadre d'une ATU nominative, ces spécialités sont inscrites sur la liste dite « liste des médicaments facturables en sus des prestations d'hospitalisation » ou « liste en sus ». Ceci permet aux établissements de facturer à l'assurance maladie les préparations de bactériophages en sus des tarifs des groupes homogènes de séjour (GHS) et d'obtenir leur remboursement à 100%.

Si les suspensions-lyophilisats de bactériophages sont considérées comme des matières premières alors leur coût sera intégré dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

Le coût de réalisation de la partie « préparation magistrale pharmaceutique » devra être ajouté et sera intégré dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

Le phagogramme ainsi que les autres tests nécessaires au diagnostic et à la prescription peuvent être, par assimilation avec les antibiogrammes, facturés aux établissements de santé, leurs coûts seront intégrés dans le tarif des prestations d'hospitalisation, à savoir dans les GHS.

VI Conclusion

Aujourd'hui, la mise à disposition précoce de suspension de bactériophages ne peut être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques ou dans un cadre compassionnel. En effet, ces suspensions de bactériophages ne disposent actuellement d'aucune AMM qui permettrait une utilisation thérapeutique de routine selon les indications reconnues dans les AMM qui pourraient être envisagées. Le seul producteur industriel de bactériophages en France est Pherecydes Pharma[®], promoteur de l'essai clinique Phagoburn. Il dispose de bactériophages contre certaines souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ainsi, au-delà de ces bactériophages, afin de traiter des infections dues à d'autres germes, il a fallu recourir, à titre dérogatoire et dans le cadre d'utilisation compassionnelle, à l'importation de suspensions-lyophilisats de bactériophages, produites par l'HMRA en Belgique ; suspensions – lyophilisats sous forme unitaire que les PUI, d'où émane la prescription d'une phagothérapie compassionnelle, doivent alors préparer pour permettre une administration sécurisée.

Un rapide tour d'horizon des capacités de production de suspensions-lyophilisats de bactériophages sous forme unitaire (matière première), des capacités de phagothèque élargies pour permettre de sélectionner un phage pertinent pour l'infection résistante, montre que les ressources en France sont très limitées. Dans ce contexte, il est important d'élargir les possibilités de mise à disposition des bactériophages en France avec notamment une production de suspension-lyophilisats de bactériophages personnalisés (pour répondre à diverses souches bactériennes infectieuses résistantes) sur le territoire national. L'ANSM encourage fortement le développement d'une production académique de bactériophages, sur le même modèle que l'HMRA en Belgique ou d'autres pays Européens. De plus, la création d'une « phagothèque » ou « banque de bactériophages » doit être discutée. Elle augmenterait considérablement le nombre et la diversité des bactériophages disponibles. Il serait possible, une fois les recommandations publiées sur les exigences en matière de production et de contrôle de la qualité pharmaceutique, de mettre à disposition des sites de production, des bactériophages caractérisés, lytiques, dont le niveau de sécurité serait adapté à une utilisation en pratique clinique. Cette phagothèque serait enrichie à chaque isolement-identification-caractérisation d'un bactériophage pour un patient donné. Ces bactériophages stockés en banque seraient ensuite disponibles pour être utilisés chez d'autres patients.

Au regard des perspectives d'utilisation de la phagothérapie dans les situations exceptionnelles de résistance, il apparaît que l'approche personnalisée « à la demande » et « sur mesure » est vraisemblablement la plus adaptée/efficace pour cibler un pathogène résistant aux autres approches thérapeutiques. A ce jour, il demeure que les différentes suspensions de bactériophages disponibles ne sont pas de qualité standardisée. Cependant, certains textes existants sur les produits biologiques et publications,

comme la Monographie nationale belge, pourraient être utilisés pour la mise en place de procédure de production et de contrôle et permettre ainsi l'évaluation de la qualité pharmaceutique des suspensions-lyophilisats de bactériophages unitaires disponibles (c'est-à-dire matière première-substances active).

Les questions de la démonstration de l'efficacité clinique et des schéma thérapeutiques optimaux des bactériophages se posent. Il n'existe pas de prérequis définis selon les standards actuels d'évaluation pour asseoir une démonstration clinique de la phagothérapie. Il est fondamental de définir les objectifs cliniques et la méthodologie des futurs essais afin de ne pas faire perdurer l'empirisme de cette thérapeutique et ainsi obtenir des données sur l'efficacité et la tolérance des bactériophages. La phagothérapie doit faire l'objet d'une évaluation approfondie et rigoureuse.

Enfin, comme précisé en préambule, ce guide n'a pas pour objet de se substituer au contenu d'un dossier d'AMM et aux évaluations au cas par cas de l'ANSM. Il sera amené à évoluer selon la législation, les recommandations européennes et françaises, les données issues des retours d'expériences des praticiens et les résultats des études précliniques et cliniques.

VII Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFMPS : Agence fédérale des médicaments et des produits de santé
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
API : active pharmaceutical ingredient
ARN : Acide ribonucléique
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
BHRé : Bactérie hautement résistante aux antibiotiques émergente
BMR : Bactérie multirésistante aux antibiotiques
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
BPP : Bonnes pratiques de préparation
CA : Certificat d'analyse
CHMP : Committee for Medicinal Products for Human Use
CEP : Certificat de conformité aux monographies de la Pharmacopée européenne
CSP : Code de la santé publique
CSST : Comité scientifique spécialisé temporaire
DASRI : Déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés
DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux
DM : Dispositif médical
DMLT : Dénombrement des moisissures/levures totales
DSI : Direction des soins infirmiers
EI : Effets indésirables
Etb : Établissement
EMA : European medicines agency (agence européenne du médicament)
EOP : Efficiency of Plaquing (paramètre d'activité d'un phage)
EOH : Équipe opérationnelle d'hygiène
FDA : Food and Drug Administration
GHS : Groupe homogène de séjour
HMRA : Hôpital militaire de la Reine Astrid
ICH : International Conference on Harmonisation
IV : Intraveineuse
JORF : Journal officiel de la République française
MTI : Médicaments de thérapie innovante
MOI : Multiplicity of infection (rapport entre le nombre de phages et le nombre de bactéries en présence)
MPUP : Matière première à usage pharmaceutique
OMS : Organisation mondiale de la santé
PFU : Plaque-forming units
PSM : Poste de sécurité microbiologique
PUI : Pharmacie à usage intérieur
PUT : Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations
RCP : Résumé des caractéristiques du produit
UFC : Unité formant colonie
UE : Union européenne
UV : Ultraviolet
ZAC : Zone à atmosphère contrôlée

VIII Définition des termes utilisés

Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) : Les bonnes pratiques de fabrication des médicaments constituent un des éléments de la gestion de la qualité qui garantit que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon cohérente, selon les normes de qualité adaptées à leur usage et requises par l'autorisation de mise sur le marché, l'autorisation d'essai clinique ou les spécifications du produit. Les BPF s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité. Le guide des BPF est destiné à servir de référence lors de l'évaluation des demandes d'autorisation de fabrication et lors de l'inspection des fabricants de médicaments (83).

Les principes des BPF et les lignes directrices particulières s'appliquent à toutes les opérations requérant les autorisations prévues aux articles 40 de la directive 2001/83/CE et 13 de la directive 2001/20/CE, tels qu'amendés (14,84). Ils s'appliquent également aux procédés de fabrication pharmaceutique, tels ceux, par exemple, mis en œuvre dans les établissements de santé.

Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) : Les bonnes pratiques de préparation constituent un des éléments de la gestion de la qualité qui garantit que les préparations pharmaceutiques sont fabriquées et contrôlées de façon cohérente, selon les normes de qualité adaptées à leur usage et leurs spécifications.

Les BPP s'appliquent à la fois à la production et au contrôle de la qualité des préparations pharmaceutiques (19).

Fabrication - production : Toutes les opérations de réception des matières, de production, de conditionnement, de reconditionnement, d'étiquetage, de ré-étiquetage, de contrôle de la qualité, de libération, de stockage et de distribution des substances actives ainsi que les contrôles associés (83).

Dans le cas des bactériophages, les développeurs-fabricants produisent-fabriquent des suspensions-lyophilisats de bactériophages sous forme unitaire, il s'agit alors de matières premières. Les pharmaciens des pharmacies à usage intérieur (PUI) seront en charge de la préparation, c'est-à-dire de la mise en forme pharmaceutique : reconstitution, dilution de ces matières premières. Ainsi, des préparations magistrales (ou hospitalières) de bactériophages seront produites par la PUI pour un patient donné (ou plusieurs si préparations hospitalières, pour le traitement d'une infection bactérienne, à partir de ces matières premières.

Matière première à usage pharmaceutique : Tout composant utilisé dans la réalisation d'une préparation (substances actives, excipients, éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés chez l'homme ou à leur être administrés) (19).

Dans le cas de bactériophages, il s'agit de suspensions ou de lyophilisats sous forme unitaire, les « *active pharmaceutical ingredient* » (API), produits par un développeur-fabricant et issus d'un procédé de production qualifié et conforme aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (83). Ces substances actives –

matières premières produites deviendront des matières de départ pour la réalisation de préparations magistrales voire hospitalières, par les PUI.

Préparation (acte de) : Terme désignant toutes les opérations de préparation et de conditionnement (y compris étiquetage et ré-étiquetage) (19). Le pharmacien a la responsabilité de la décision de la réalisation des préparations.

Les missions des PUI comportent notamment la préparation, le contrôle et l'approvisionnement des médicaments, conformément à l'article L.5126-5 du code de la santé publique (85). Les opérations de préparation suivent des instructions et des procédures définies. Elles répondent aux principes des bonnes pratiques de préparation (BPP) en vue d'obtenir des préparations de la qualité requise. Les spécificités de la préparation sont définies dans le dossier de préparation. Une préparation n'est entreprise que si le pharmacien responsable de cette activité possède les moyens appropriés spécifiques (équipements, matériels, personnels, locaux...) pour la réaliser et la contrôler.

Préparation pharmaceutique : Médicament, généralement constitué de substance(s) active(s) éventuellement combinées à un/des excipient(s), qui est formulé et mis en forme pharmaceutique de façon à être adapté à l'usage qui en est prévu, si nécessaire après reconstitution, et qui est présenté dans un récipient approprié, convenablement étiqueté. Une préparation pharmaceutique est réalisée pour les besoins spécifiques d'un ou plusieurs patients conformément à la législation. Les préparations pharmaceutiques se divisent en 2 catégories :

- les préparations extemporanées, qui sont préparées individuellement pour un patient ou un groupe de patients spécifique et délivrées après leur préparation ;
- les préparations stockées, qui sont préparées à l'avance et conservées jusqu'à réception d'une demande de délivrance (19).

Le Code de la Santé Publique (CSP) décrit 3 sortes de préparations : préparation magistrale, préparation hospitalière et préparation officinale (Article L.5121-1 du CSP) (86).

Préparation terminée : Médicament qui a subi tous les stades de la réalisation de la préparation, y compris le conditionnement final (19).

Produit fini : Médicament qui a subi tous les stades de la fabrication, y compris le conditionnement.

Les produits finis, fabriqués par un établissement pharmaceutique, contiennent des principes actifs pharmaceutiques conformes à la formule qualitative et quantitative de l'autorisation de mise sur le marché (AMM), ou de l'autorisation temporaire d'utilisation (ATU) ou de l'autorisation d'essai clinique. Ils ont la pureté requise, sont contenus dans l'emballage correct et sont correctement étiquetés.

La préparation – mise en forme pharmaceutique (reconstitution...) de ces produits finis sera conforme au résumé des caractéristiques du produit (RCP) dans le cadre d'un produit disposant d'une AMM, ou au protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations (PUT) pour un médicament sous ATU (83).

Reconstitution : Manipulation permettant l'utilisation ou l'administration d'un médicament. Les médicaments disposant d'une AMM, délivrée par une agence de sécurité du médicament compétente, sont reconstitués conformément aux instructions figurant dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) ou dans la notice d'information du patient, ou dans le protocole du médicament expérimental. Lorsqu'elle est réalisée en pharmacie, elle respecte les présentes BPP. La reconstitution des spécialités pharmaceutiques ou de médicaments expérimentaux est une opération de mélange simple notamment d'une solution, d'une poudre, d'un lyophilisat, etc. avec un solvant pour usage parentéral ou non (19).

La reconstitution des suspensions-lyophilisats de bactériophages « unitaires », qui disposent du statut de matière première, est une opération de mélange simple notamment d'une ou plusieurs suspensions, d'un ou plusieurs lyophilisats, pour former *in fine* un cocktail de bactériophages, avec un solvant pour usage parentéral ou non. La reconstitution des suspensions-lyophilisats de bactériophages doit être réalisée selon les dispositions définies dans les BPP (19).

IX Bibliographie

1. Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie: Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *médecine/sciences*. 2017;33(4):410-6.
2. Dufour N. Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité [Microbiologie]. Université Paris 7 – Paris Diderot; 2015.
3. Dublanchet A. La phagothérapie. Des virus pour combattre les infections. *Renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques*. Lausanne: Favre SA; 2017. 247 p.
4. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2015;28(1):13-20.
5. Abedon ST. Bacteriophage Clinical Use as Antibacterial "Drugs": Utility and Precedent. *Microbiology Spectrum* [Internet]. 1 août 2017 [cité 21 mai 2020];5(4). Disponible sur: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.BAD-0003-2016>
6. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 10 juin 2019;63(8):e00379-19, /aac/63/8/AAC.00379-19.atom.
7. Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;64(11):1582-8.
8. Bruttin A, Brüssow H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(7):2874-8.
9. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine*. 2016;4:124-37.
10. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(1):35-45.
11. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009;34(4):349-57.
12. Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC urology*. 2017;17(1):90.
13. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Compte rendu de séance du comité spécialisé temporaire Phagothérapie – Retour d'expérience et perspectives. 2019 mars.
14. Commission européenne, 2001. Directive 2001/83/CE du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. *Journal officiel* n° L 311 du 28/11/2001 p. 0067–0128. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000518889>
15. Commission européenne, 2004. Directive 2004/27/CE du 31 mars 2004 modifiant la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. *Journal officiel* n° L 136 du 30/04/2004 p. 0034–0057. [Internet]. p. 0034–0057. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000520345&categorieL>

ien=id

16. Pelfrene E, Willebrand E, Cavaleiro Sanches A, Sebris Z, Cavaleri M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(8):2071-4.
17. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Compte rendu de séance comité spécialisé temporaire Phagothérapie. 2016 mars.
18. Code de la santé publique. Article L.5111-1 relatif à la définition du médicament. Version en vigueur au 27 février 2007. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689867>
19. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Bonnes pratiques de préparation. Edition 2019 [Internet]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/70ab5faa689e8a46677e68e366a27f5c.pdf
20. Dublanchet A. Qu'est-ce que la phagothérapie ? *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale*. 2014;4(4):354-70.
21. Letarov A, Kulikov E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;107(1):1-13.
22. Méndez J, Audicana A, Cancer M, Isern A, Llana J, Moreno B, et al. Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *Journal of Water and Health*. 2004;2(3):201-14.
23. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(12):3677-86.
24. Ackermann H-W. Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2009;501:127-40.
25. Code de la santé publique. Article L.5111-2 relatif aux spécialités pharmaceutiques. Version en vigueur en 22 juin 2000. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689868&dateTexte=20120907>
26. Code de la santé publique. Article R5121-68 relatif aux demandes d'autorisation temporaire d'utilisation Version en vigueur au 21 janvier 2013. [Internet]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=28B6DF60676795CD3BB653C291BD20C1.tpdjo15v_1?idSectionTA=LEGISCTA000026968491&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20140430
27. General monograph – version 1.0 Phage active pharmaceutical ingredients. In.
28. Pirnay J-P, Merabishvili M, Van Raemdonck H, De Vos D, Verbeken G. Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2018;1693:233-52.
29. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, De Vos D, Verbeken G, et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. 2014;9(8):1-11.
30. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceysens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The Magistral Phage. *Viruses*. 2018;10(2).
31. Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS One*. 2009;4(3):1-10.
32. Pirnay J-P, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharmaceutical Research*. 2015;32(7):2173-9.
33. Commission européenne 2006. Directive 2006/17/CE de la Commission du 8 février 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au don, à l'obtention et au contrôle de tissus et de cellules

- d'origine humaine. Journal officiel n° L 38 du 09/02/2006 p. 0040 - 0052 [Internet]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:038:0040:0052:FR:PDF>
34. Commission européenne, 2006. Directive 2006/86/CE de la Commission du 24 octobre 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences de traçabilité, la notification des réactions et incidents indésirables graves, ainsi que certaines exigences techniques relatives à la codification, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution des tissus et cellules d'origine humaine. Journal officiel n° L 294 du 25/10/2006 p. 0032 [Internet]. Disponible sur: http://sfbct.free.fr/new/texte_documentation/7.pdf
 35. Commission européenne 2004. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains. Journal officiel n° L 102 du 07/04/2004 p. 0048 - 0058. [Internet]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0023&from=LV>
 36. European Medicines Agency. Note for guidance on Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. (CPMP/ICH/294/95). 2006;13.
 37. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry- Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications [Internet]. 2010. Disponible sur: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/vaccines/ucm202439.pdf>
 38. Fauconnier A. Guidelines for Bacteriophage Product Certification. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2018;1693:253-68.
 39. Merabishvili M, Pirnay J-P, De Vos D. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol Biol*. 2018;1693:99-110.
 40. World Health Organization. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814; 2013.
 41. Mutti M, Corsini L. Robust Approaches for the Production of Active Ingredient and Drug Product for Human Phage Therapy. *Front Microbiol*. 8 oct 2019;10:2289.
 42. Pr Dupon M. Phagothérapie dans les infections ostéo-articulaires. Octobre 2016. [Internet]. Disponible sur: <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/desc/2016/seminaire-octobre-2016/phagottt-16-09-pr-michel-dupon.pdf>
 43. Standard Treatment Associated With Phage Therapy Versus Placebo for Diabetic Foot Ulcers Infected by *S. Aureus* - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02664740>
 44. Verheust C, Pauwels K, Mahillon J, Helinski DR, Herman P. Contained use of Bacteriophages: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Applied Biosafety*. 2010;15(1):32-44.
 45. Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A, Owczarek B, Wojas-Turek J, Kicielińska J, et al. T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS ONE*. 2013;8(8):1-13.
 46. Żaczek M, Łusiak-Szelachowska M, Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Międzybrodzki R, Owczarek B, et al. Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1681):1-14.
 47. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(5):317-27.

48. Venail P, Fresillon C, Pillaire MJ, Perrin E. Le cahier de prévention risque biologiques. 4ème édition. 2017;88.
49. Safety And Efficacy Of Bacteriophage Therapy: Analysis Of Clinical Case Series Data. Aslam, S., Gilbey, T., Maddocks, S., Morales, S., Lehman, S., Branston, S., Fabijan, A.P., Furr, C-L.L., Rosas, F., Bilinsky, I., Grint, P., Schooley, R.T., and Iredell, J. *Open Forum Infectious Diseases*. 2018 5(suppl_1): S47.
50. Gilbey T, Ho J, Cooley LA, Fabijan AP, Iredell JR. Adjunctive bacteriophage therapy for prosthetic valve endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal of Australia*. 2019;211(3):142-143.e1.
51. Ooi ML, Drilling AJ, Morales S, Fong S, Moraitis S, Macias-Valle L, et al. Safety and Tolerability of Bacteriophage Therapy for Chronic Rhinosinusitis Due to *Staphylococcus aureus*. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 20 juin 2019;
52. Law N, Logan C, Yung G, Furr C-LL, Lehman SM, Morales S, et al. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*. 1 août 2019;47(4):665-8.
53. Aslam S, Pretorius V, Lehman SM, Morales S, Schooley RT. Novel bacteriophage therapy for treatment of left ventricular assist device infection. *J Heart Lung Transplant*. avr 2019;38(4):475-6.
54. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS ONE*. 2017;12(1):1-16.
55. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(5):2141-51.
56. Fong SA, Drilling A, Morales S, Cornet ME, Woodworth BA, Fokkens WJ, et al. Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7:418.
57. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2009;501:141-9.
58. Khan Mirzaei M, Nilsson AS. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. Schuch R, éditeur. *PLOS ONE*. 2015;10(3):1-13.
59. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 69-76. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7
60. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 77-80. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_8
61. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, éditeurs. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 81-5. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9
62. Miller RV. Methods for enumeration and characterization of bacteriophages from environmental samples. In: *Techniques in Microbial Ecology*. 1998. p. 218-35.
63. Adams MH. *Bacteriophages* [Internet]. New York, Interscience Publishers; 1959. 624 p. Disponible sur: <http://archive.org/details/bacteriophages00adam>

64. Hoe S, Semler DD, Goudie AD, Lynch KH, Matinkhoo S, Finlay WH, et al. Respirable Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Lung Infections. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2013;26(6):317-35.
65. Hoe S, Boraey MA, Ivey JW, Finlay WH, Vehring R. Manufacturing and Device Options for the Delivery of Biotherapeutics. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 2013;27(5):315-28.
66. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(10):1253-64.
67. Ferry T, Boucher F, Fevre C, Perpoint T, Chateau J, Petitjean C, et al. Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages. *J Antimicrob Chemother*. 2016;73(10):2901-3.
68. Ferry T, Leboucher G, Fevre C, Herry Y, Conrad A, Josse J, et al. Salvage Debridement, Antibiotics and Implant Retention (“DAIR”) With Local Injection of a Selected Cocktail of Bacteriophages: Is It an Option for an Elderly Patient With Relapsing *Staphylococcus aureus* Prosthetic-Joint Infection? *Open Forum Infectious Diseases*. 2018;5(11):1-4.
69. Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Encapsulation of Bacteriophage in Liposome Accentuates Its Entry in to Macrophage and Shields It from Neutralizing Antibodies. *PLoS One*. 2016;11(4):1-16.
70. Singla S, Harjai K, Raza K, Wadhwa S, Katare OP, Chhibber S. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistribution. *Journal of Virological Methods*. 2016;236:68-76.
71. Abedon S. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Advances in Applied Microbiology*. 2011;77:1-40.
72. Abedon ST. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*. 2016;6(3):1-6.
73. Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2012;65(2):395-8.
74. Clark WA. Comparison of Several Methods for Preserving Bacteriophages. *Appl Microbiol*. sept 1962;10(5):466-71.
75. Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Front Microbiol*. 2016;7:1177.
76. Commission européenne. Directive 2000/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail (septième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE) *Journal officiel* n° L 262 du 17/10/2000 p. 0021 - 0045 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000879517&categorieLien=id>
77. Société Française d'Hygiène Hospitalière, SF2H. Guide pour le choix des désinfectants - Produits de désinfection chimique pour les dispositifs médicaux, les sols et les surfaces - Hygiènes - Volume XXII - N° 6 - Janvier 2015.
78. L'Institut national de recherche et de sécurité (INRS), Christine David et Isabelle Balty. La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie. s. d., 40,; 2014.
79. Clark EM, Wright H, Lennon K-A, Craik VA, Clark JR, March JB. Inactivation of Recombinant Bacteriophage Lambda by Use of Chemical Agents and UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(8):3033-6.
80. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H). Actualisation des précautions standard

- Etablissements de santé, Etablissements médicosociaux, Soins de ville. Volume XXV - N° Hors série; 2017.

81. Briers Y, Miroshnikov K, Chertkov O, Nekrasov A, Mesyanzhinov V, Volckaert G, et al. The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage phiKZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;374(4):747-51.

82. Code de la santé publique. Article L5123-2 relatif au prix et agrément des médicaments à usage humain. Version en vigueur au 25 décembre 2013. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689956&dateTexte=&categorieLien=cid>

83. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Guide des bonnes pratiques de fabrication. Mai 2019.

84. Commission européenne, 2001. Directive 2001/20/CE du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain [Internet]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_20/dir_2001_20_fr.pdf

85. Code de la santé publique. Article L5126-5 relatif aux pharmacies à usage intérieur. Version en vigueur au 19 janvier 2018 [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690078&dateTexte=&categorieLien=cid>

86. Code de la santé publique. Article L.5121-1 relatif aux médicaments à usage humain. Version en vigueur au 1er juillet 2017. [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000026499732&cidTexte=LEGITEXT000006072665>

87. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*. 2013;443(2):187-96.

ANNEXE 1

Algorithme de mise à disposition des bactériophages selon le statut de la préparation

Prescription conforme :

- à l'AMM ;
- aux connaissances scientifiques, données établies du savoir médical (recommandations de bonnes pratiques) ;
- à l'analyse individuelle du rapport bénéfice/risque.

Oui

Préparation de bactériophages disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM)

Non

Existe-t-il une recherche biomédicale impliquant la personne humaine en cours en rapport avec la pathologie du patient utilisant des bactériophages ?

Oui

Recherche impliquant la personne humaine :

- Article L1121-1 du code de la santé publique
- Décret n° 2016-1537 du 16 Novembre 2016

Inclusion du patient à la recherche biomédicale dans le respect du protocole.

Non

Oui

Il s'agit d'une **spécialité pharmaceutique** (article L.5111-2 du code de la santé publique²) : mise à disposition selon une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU)³. Cet ATU nominative vaut autorisation d'importation dans le cas d'établissements pharmaceutiques situés à l'étranger.⁴ Dans la mesure où un système d'ATU nominative est requis, les demandes doivent être subordonnées à l'exploitation d'un protocole d'utilisation thérapeutique (PUT) et de recueil des informations, l'objectif étant de permettre d'une part d'assurer la sécurité, le suivi et l'information du patient, et d'autre part d'améliorer la connaissance sur les bactériophages.

La mise à disposition du produit n'est possible que dans une structure hospitalière.¹ S'agit-il d'un produit dont (les 2 critères devant être présents) :

1. La fabrication est industrielle, conforme aux Good Manufacturing Practices (GMP)/ Bonnes pratiques de fabrication (BPF), réalisée par un établissement autorisé par l'ANSM ou l'autorité de contrôle du pays où est implanté l'établissement.

2. La qualité pharmaceutique intrinsèque est garantie par un développement pharmaceutique pertinent, une stratégie de contrôle qualité qui permet d'assurer la qualité finale, et conforme aux référentiels en vigueur.

Non

Cadre compassionnel
= statut de matière première⁵
(Article L5138-2 du code de la santé publique)

L'utilisation clinique des bactériophages sera réalisée sous la responsabilité du prescripteur et du pharmacien hospitalier.

Oui

Production de la matière première en France ?

Non

Fabrication en France.
Exemple par la société Pherecydes Pharma ®.
Discussion collégiale autour du cas. L'ANSM accompagne les équipes hospitalières dans le processus de mise à disposition.

Fabrication par un pays membre de l'Union Européenne.
Exemple : fabrication par l'équipe de l'hôpital de la Reine Astrid à Bruxelles.
Discussion collégiale autour du cas. L'ANSM délivre une **autorisation d'importation dérogatoire à visée diagnostique** (si réalisation du phagogramme au sein de l'établissement de santé), puis une **autorisation d'importation dérogatoire à visée thérapeutique**.

1. Le pharmacien hospitalier doit évaluer la qualité pharmaceutique des matières premières.
Cf. partie IV.4.a: Évaluation de la qualité pharmaceutique des matières premières de bactériophages

2. Le pharmacien hospitalier réalisera ensuite la préparation (magistrales ou hospitalière⁶) ainsi que le contrôle de la qualité pharmaceutique de la préparation de bactériophages.
Cf. partie IV.4.b : La préparation et le contrôle de la qualité pharmaceutique

¹ Les suspensions-lyophilisats de bactériophages ne peuvent être mis à disposition qu'auprès d'une pharmacie à usage intérieur d'un établissement hospitalier, ceci nécessite donc un suivi dans un service hospitalier.

² Article L5111-2 du code de la santé publique : « On entend par spécialité pharmaceutique, tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale. »

³ Concernant les ATU dites nominatives, l'ANSM peut autoriser l'utilisation, à titre exceptionnel, de certains médicaments destinés à traiter, prévenir ou diagnostiquer des maladies graves ou rares, lorsqu'il n'existe pas de traitement approprié, et que leur efficacité et leur sécurité d'emploi sont présumées en l'état des connaissances scientifiques. Ce type d'accès aux médicaments s'adresse à un seul patient nommément désigné ne pouvant participer à une recherche biomédicale, concerne des médicaments dont le rapport efficacité/sécurité est présumé favorable pour ces patients au vu des données disponibles, et est délivré à la demande et sous la responsabilité du médecin prescripteur dès lors que le médicament est susceptible de présenter un bénéfice pour ce patient.

⁴ Conformément aux articles L.5124-13 et R.5121-108 du code de la santé publique, l'ATU nominative (ATUn) et l'ATU de cohorte (ATUc) valent autorisation d'importation. Par conséquent, il n'est pas nécessaire de solliciter auprès de l'ANSM, une autorisation d'importation pour les médicaments bénéficiant d'une ATUn ou d'une ATUc. Cependant, l'importation d'un médicament en ATU nominative à des fins de constitution de stocks par un établissement pharmaceutique ou par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé nécessite l'obtention préalable d'une autorisation spécifique délivrée par le directeur général de l'ANSM.

⁵ L'article L.5138-2 donne la définition suivante : "On entend par matières premières à usage pharmaceutique tous les composants des médicaments au sens de l'article L.5111-1, c'est-à-dire :

- la ou les substances actives ;
- le ou les excipients ;
- les éléments de mise en forme pharmaceutique destinés à être utilisés chez l'homme ou chez l'animal ou à leur être administrés."

Dans le cadre de la transposition en droit interne de la directive 2011/62/UE du 8 juin 2011 qui vise à la lutte contre la falsification de médicaments, l'article L. 5138-1 du code de la santé publique modifié par l'ordonnance n° 2012-1427 du 19 décembre 2012 prévoit :

- un régime d'autorisation pour les établissements exerçant des activités de fabrication, d'importation et de distribution de substances actives
- un régime déclaratif pour les établissements exerçant ces mêmes activités pour les excipients

Le décret d'application de cette ordonnance fixe les modalités des demandes d'autorisation et de déclaration de ces activités (décret n° 2012-1562 du 31 décembre 2012). La décision du directeur général de l'ANSM du 24 février 2015 fixe la forme et le contenu de la demande d'autorisation et de déclaration de ces activités. Elle abroge la décision DG n° 2013-104 du 21 mars 2013 et modifie les modalités de mise à jour des télé-enregistrements.

Les renseignements administratifs et techniques doivent être soumis à l'ANSM via un portail de télé-enregistrement.

Les modifications "annuelles" doivent être dorénavant communiquées dans un délai de 12 mois à partir de la date du précédent télé-enregistrement.

Doivent être notifiées sans délai :

- toute modification des renseignements administratifs
- toute modification susceptible d'avoir une incidence sur la qualité ou la sécurité des matières premières à usage pharmaceutique
- toute cessation d'activité

[http://ansm.sante.fr/Activites/Matieres-premieres-a-usage-pharmaceutique-MPUP/Autorisation-et-declaration-des-activites-de-fabrication-d-importation-et-de-distribution/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Matieres-premieres-a-usage-pharmaceutique-MPUP/Autorisation-et-declaration-des-activites-de-fabrication-d-importation-et-de-distribution/(offset)/0)

⁶Article L5121-1 (Modifié par ordonnance n°2016-1729 du 15 décembre 2016 - art. 2) : « On entend par :

1° Préparation magistrale, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-6 ;

2° Préparation hospitalière, tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-6. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé ;

3° Préparation officinale, tout médicament préparé en pharmacie, inscrit à la pharmacopée ou au formulaire national et destiné à être dispensé directement aux patients approvisionnés par cette pharmacie [...] »

ANNEXE 2

Essais cliniques utilisant des bactériophages

1. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION CUTANEE

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)	
Titre de l'étude	Essai clinique de phase I/II, randomisé (1:1), multicentrique, européen, contrôlé <i>versus</i> comparatif actif (standard of care), dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et la tolérance d'un cocktail de bactériophages dans le traitement d'infections cutanées à <i>P. aeruginosa</i> chez des patients brûlés. Initialement l'essai testait également un cocktail de bactériophages actifs sur <i>E. coli</i> . Mais en janvier 2016, compte tenu du faible niveau de recrutement des patients présentant une infection cutanée à <i>E. coli</i> (n=1), il a été décidé d'arrêter l'évaluation clinique des bactériophages anti- <i>E. coli</i>
Statut de l'essai clinique	Terminé Début : 22 Juillet 2015 → Fin : 2 Janvier 2017 en raison d'une efficacité insuffisante du traitement PP1131.
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus, hospitalisés dans un centre de traitement des brûlés et présentant : - une brûlure cutanée infectée à <i>P. aeruginosa</i> , confirmée par des prélèvements microbiologiques ; Initialement, pour être inclus le patient devrait présenter une infection monobactérienne à <i>P. aeruginosa</i> . Cependant, suite à un amendement, une colonisation mineure par d'autres germes était acceptée. - un ou plusieurs signes cliniques d'infection selon les critères définis par la Société Française d'Étude et de Traitement des Brûlures. Suite à l'amendement, tout patient présentant une augmentation du Score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) de 2 points ou plus dans les 48 heures précédant l'inclusion, était exclu.
Critère de jugement principal	Temps nécessaire pour obtenir une réduction durable de la charge bactérienne de deux quadrants ou plus selon la méthode d'ensemencement à quatre quadrants (méthode semi-quantitative), analyse statistique multivariée avec ajustement selon la prise ou non d'antibiotiques actifs sur <i>P. aeruginosa</i> entre J0 et J7. Des prélèvements microbiologiques quotidiens ont été réalisés.
Autres critères de jugement	La tolérance au traitement a été évaluée chez tous les patients ayant reçu au moins une dose du traitement (suspension de bactériophages PP1131/crème de sulfadiazine). Une étude ancillaire (sensibilité de la souche bactérienne isolée chez les patients vis-à-vis des bactériophages à J7, stabilité de la suspension de bactériophages) a été menée afin de déterminer les raisons des succès ou des échecs du traitement PP1131.
Traitements expérimentaux	- Traitement standard : crème de sulfadiazine argentique 1% ; - Suspension PP1131 de 12 bactériophages lytiques anti - <i>P. aeruginosa</i> (1 ^{ère} préparation de bactériophages dont la fabrication était conforme aux BPF).
Design de l'étude	L'étude comporte 2 bras : - Bras contrôle : crème de sulfadiazine argentique 1% ; application en topique local de la crème sans support vecteur, directement sur la peau ; - Bras traitement : suspension liquide PP1131 de 12 bactériophages lytiques anti- <i>P. aeruginosa</i> ; imprégnation d'un EOP neutre par la suspension PP1131, suivi de l'application en topique local de ce support « vecteur de bactériophages » sur la plaie à traiter ; support neutre : pansement Algostéril®

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite	Durée et fréquence d'administration du traitement : 1 application par jour pendant 7 jours. Période de suivi : 14 jours Durée totale de l'étude : 21 jours. La co-prescription d'antibiotiques était autorisée au cours des 7 jours de traitement de l'étude, à la discrétion du clinicien. Le clinicien n'était pas en aveugle en raison des formes galéniques différentes des 2 traitements de l'étude. Les microbiologistes et les patients étaient en aveugle.
Résultats	Nombre de patients inclus au total : 27 Nombre de patients pour l'évaluation de l'efficacité du traitement = 25 (N = 12 traitements PP1131, N = 13 dans le bras contrôle) Nombre de patients pour l'évaluation de la tolérance au traitement = 26 (N = 13 traitements PP1131, N = 13 dans le bras contrôle) Résultats pour le critère de jugement principal (analyse réalisée en intention de traité modifiée) ; Différence du temps médian pour obtenir une diminution de deux quadrants ou plus. La prise ou non d'antibiotiques actifs sur <i>P. aeruginosa</i> peut être un biais de confusion, il s'agit d'un facteur accessoire par rapport au critère de jugement principal qui peut masquer ou causer des différences. Le modèle de régression de Cox a donc été appliqué ici afin de prendre en compte ce facteur de confusion. Ainsi des analyses multivariées ont été réalisées afin de rééquilibrer les 2 groupes par ajustement statistiques selon la prise ou non d'antibiotiques actifs <i>P. aeruginosa</i> entre J0 et J7. - Délai médian dans le bras traitement par bactériophages = 144 heures (95% CI 48– not reached) ; - Délai médian dans le bras contrôle = 47 heures (23 – 122 ; hazard ratio [HR] 0,29 [95% CI 0,10–0,79]). Délai médian significativement supérieur dans le bras traitement par bactériophages par rapport au bras contrôle (p = 0,018). La co-administration d'antibiotiques (initié à J0 ou au cours de la période de traitement de l'étude) actifs sur <i>P. aeruginosa</i> ne modifie pas l'efficacité des traitements (traitement standard ou traitement par bactériophages). Évaluation de la tolérance aux traitement administrés (analyse en per protocole) : 3 patients sur 13 ont présenté des effets indésirables dans le bras « traitement par bactériophages » <i>versus</i> 7 sur 13 dans le bras « traitement standard » → Différence non significative.
Limites de l'étude	- Faible nombre de patients inclus (critères d'inclusions trop restrictifs et problèmes de production) : puissance statistique faible. Initialement dimensionnée pour une centaine de patients par bras traitement, l'étude a finalement abouti au recrutement de 27 patients dont 25 ont fourni des données exploitables. Ce faible niveau d'inclusion a transformé PhagoBurn en une étude de preuve de concept clinique. - Groupe non comparable sur les critères « âge », « sévérité des brûlures », « charge bactérienne initiale » : les patients traités avec la suspension PP1131 étaient plus âgés et plus sévèrement brûlés. Or, l'âge et la sévérité des brûlures sont 2 facteurs de risque de sévérité des brûlures. La charge bactérienne initiale était plus élevée chez les patients traités avec la suspension P1131. En comparant les profils de sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes des patients des 2 bras, il a été montré que les souches bactériennes des patients du bras contrôle étaient sensibles, à J0, à un plus grand nombre d'antibiotiques.

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite	- Le succès du traitement par bactériophages dépend de la sensibilité de la souche bactérienne aux bactériophages testés : or, dans cet essai, le phagogramme n'était pas réalisé avant la mise sous traitement. Une étude ancillaire, menée chez les patients pour lesquels un échec au traitement par bactériophages a été observé (analyse per-protocole), a révélé que les bactéries isolées étaient majoritairement résistantes aux doses de bactériophage administrées. Dans le bras traitement par bactériophages : parmi les patients pour lesquels il n'a pas été observé une réduction de la charge bactérienne de 2 quadrants ou plus, un phagogramme a été réalisé <i>a posteriori</i> (n = 5 patients) : 24% des souches bactériennes étaient sensibles au cocktail de bactériophages PP1131, 60% étaient de sensibilité intermédiaire et 16% étaient résistantes. Dans le bras traitement par bactériophages : un phagogramme a été réalisé <i>a posteriori</i> avec les souches bactériennes des patients pour lesquels il a été observé une réduction de la charge bactérienne de 2 quadrants ou plus (n = 5 patients) : 89% des souches bactériennes étaient sensibles au cocktail de bactériophages PP1131, 11% étaient de sensibilité intermédiaire et aucune n'étaient résistantes. Aucune information n'a été donnée sur le type de résistance et leurs mécanismes moléculaires. - Des études de stabilité ont révélé une décroissance du titre de la suspension à 1×10^5 PFU/mL-1×10^4 PFU/mL (titre initial de 1×10^9 PFU/ml). Or, des dilutions étaient nécessaires afin de réduire la concentration en endotoxines, ainsi le titre de la suspension de bactériophages appliquée quotidiennement était seulement d'environ 1×10^2 PFU/ml. Selon les données de la littérature et les études précliniques, il avait été décidé d'utiliser une multiplicity of infection (rapport du nombre de bactériophages sur le nombre de bactéries, MOI) de 10. Or étant donné que le titre de la suspension était inférieur à celui initialement prévu et que la charge bactérienne était très élevée, la MOI au niveau du site infecté était plus faible. Ceci a pour principales conséquences : ○ l'amplification virale au niveau du foyer infectieux est plus lente; ○ une lyse bactérienne plus lente → décroissance plus lente de la charge bactérienne. Le nettoyage quotidien de la plaie a probablement eu un effet négatif sur l'activité des bactériophages. - Différence dans l'application des 2 traitements : application directe du traitement standard <i>versus</i> utilisation d'un support vecteur pour le traitement par bactériophages - Des études précliniques ont démontré <i>in vitro</i> que, pour des suspensions de bactériophages dont le titre était de 10^9 PFU/mL l'utilisation d'un support n'avait aucun impact sur la libération des bactériophages, aucun effet de « trapping » n'avait été observé. Or, cet effet ne peut être exclu pour une suspension dont le titre est plus faible. - L'étude a été stoppée entre le 02/01/2016 et le 31/05/2016 suite à des amendements au protocole et à des problèmes de stabilité. Certains critères d'inclusions ont été modifiés : initialement la brûlure devait être infectée uniquement par <i>P. aeruginosa</i>. L'analyse des données épidémiologiques issues des centres, a abouti à une surestimation du nombre d'infections cutanées monobactériennes à <i>P. aeruginosa</i>. Dans les dossiers médicaux, les centres ne faisaient pas les distinctions entre les infections monobactériennes et les infections polymicrobiennes. Suite à l'amendement, une colonisation mineure par d'autres germes était acceptée. - Le manque de stabilité de PP1131 au cours du temps a obligé les coordinateurs à interrompre l'étude de janvier à mai 2016, concourant ainsi à réduire la durée de l'étude clinique à un total de 13 mois. - L'absence d'effet indésirable grave peut être expliqué par le faible titre de la préparation.
-------	---

Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn (10)

suite
Conclusions

Il s'agit d'un essai exploratoire. L'étude est négative sur le critère de jugement principal et présente de nombreuses limites.
Le profil de tolérance de la suspension de bactériophages anti - *P. aeruginosa* PP1131 était acceptable mais probablement biaisé en raison du faible titre de la préparation.

2. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION ORL CHRONIQUE

Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique (11)

Titre de l'étude	Essais clinique visant à évaluer l'efficacité thérapeutique des bactériophages dans les otites chroniques à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistant : Essai clinique phase I/II prospectif, monocentrique, en double aveugle, randomisé, contrôlé <i>versus</i> placebo.
Statut de l'essai clinique	Terminé Lors de l'analyse intermédiaire, il a été décidé d'arrêter l'étude précocement, à l'inclusion 24 ^{ième} patients. En effet, les données d'efficacité disponibles étaient suffisantes pour conduire une étude pilote de phase III.
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus présentant une otite chronique à <i>P.aeruginosa</i> multirésistant. Une étude de la sensibilité de la souche bactérienne <i>P.aeruginosa</i> isolée aux bactériophages étaient réalisée avant l'inclusion. La souche bactérienne isolée devait être sensible au minimum à un des six bactériophages contenus dans le cocktail.
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal était clinique : évaluation des lésions par le médecin avec un score composite et évaluation par le patient de ses symptômes avec un autre score. Les paramètres suivants étaient évalués par les médecins via une échelle visuelle : érythème/inflammation, ulcération/granulation/polypes, écoulement de type purulent/muqueux/ muco-purulent, quantité évacuée, odeur. Les paramètres suivants étaient évalués par les patients via une échelle visuelle : inconfort, démangeaison, écoulement, odeur.
Autres critères de jugement	Le critère de jugement secondaire était le compte bactérien et le titre des bactériophages. Un dénombrement des bactéries ainsi que des bactériophages présents dans la cavité auriculaire a été réalisé à J0, J7, J21 et J42. La tolérance au traitement a été évaluée à chaque visite à l'aide d'un questionnaire patient.
Traitements expérimentaux	- Placebo, composition : mélange de glycérol et PBS ; - Une suspension contenant 6 bactériophages lytiques anti - <i>P. aeruginosa</i> , le titre de la suspension était 1x10 ⁵ PFU/mL (Biophages PA®).
Design de l'étude	2 bras : - Bras contrôle : placebo ; - Bras traitement : cocktail de phages anti - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Les patients reçoivent une dose locale unique, dans une oreille, de 200 µL d'un cocktail de bactériophages anti - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou du placebo en intra-auriculaire à J0. Aucun traitement supplémentaire n'était autorisé (antibiotique ou autre traitement en systémique ou en topique local). Un lavage auriculaire était réalisé seulement à J7, J21 et J42. Un audiogramme ainsi qu'une otoscopie étaient réalisés à J0 et J42. Une surveillance des patients étaient réalisées à J0, pendant 6h après l'administration. Les patients étaient suivis à J7, J21 et J42 après l'administration du médicament expérimental.
Résultats	24 patients ont été inclus, 12 dans chaque bras. 86,2% de souches bactériennes étaient sensibles à au moins un des six bactériophages contenus dans les cocktails. Au sujet de l'évaluation des signes cliniques par le médecin : il a été observé une réduction significative de l'intensité des différents symptômes par rapport au niveau de base à l'inclusion chez les patients traités par le cocktail de bactériophages : érythème/inflammation (p = 0,027), ulcération/granulation/polypes

Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique (11)

suite	(p=0,040), écoulement de type purulent/muqueux/ muco-purulent (p = 0,043), odeur (p = 0,026). Aucune différence significative de l'intensité des symptômes n'a été observée chez les patients du groupe placebo. Au sujet de l'évaluation des signes cliniques par le patient, il a été observé une réduction significative de l'intensité des 3 symptômes par rapport au niveau de base à l'inclusion chez les patients traités par le cocktail de bactériophages : inconfort (p = 0,003), démangeaison (p = 0,001), écoulement (p = 0,001). Aucune différence significative de l'intensité des symptômes n'a été observée chez les patients du groupe placebo. Chez certains patients traités par bactériophages il a été observé une réduction de 80% de la symptomatologie initiale. La réduction moyenne était de 50%. Aucun patient dans le groupe placebo n'a présenté une telle amélioration des symptômes, la réduction moyenne étant de 20%. Une réduction significative du nombre de bactéries <i>P. aeruginosa</i> a été observée dans le groupe « traitement par bactériophages » (p < 0,0001), aucune différence significative n'a été observée dans le groupe placebo. Les bactériophages se sont multipliés au cours du traitement : dose initiale de bactériophages : 6×10^5 PFU/mL, quantité moyenne de bactériophages dans la cavité auriculaire au cours des visites de suivi = $1,27 \times 10^8$ PFU/mL. Aucun effet indésirable grave n'a été rapporté. Les effets indésirables rapportés ne sont pas imputables au traitement.
Limites de l'étude	- L'évaluation du critère principal est réalisée à l'aide d'une échelle visuelle analogique, ce type d'évaluation est subjective. Il peut exister un biais d'information non différentiel lié à la méthode de mesure du critère principal. - A propos des critères d'inclusion, il est indiqué dans le titre, que cette étude s'adresse à des patients souffrant d'otites chroniques à <i>P.aeruginosa</i> multirésistant. La définition de la maladie n'est pas basée sur un consensus de critères internationaux. Les critères d'inclusions peuvent donc sembler larges, non clairement définis. La population de l'étude peut donc présenter des signes cliniques hétérogènes, de gravités différentes : de la simple colonisation à l'otite. - Nombre de patients limité. - La numération de <i>P. aeruginosa</i>, réalisée au dernier jour de l'essai, a montré une faible diminution moyenne, de 9×10^9 à 2×10^9 UFC/g d'échantillon, l'effet est donc de faible amplitude. - Il a été observé pour certain patient une persistance de la souche bactérienne dans la cavité auriculaire (présence de bactéries confirmée lors du dénombrement). Pour ces patients, le schéma thérapeutique en une dose unique peut être discuté, une nouvelle administration pourrait être envisagée en fonction des résultats microbiologiques.
Conclusions	L'étude était positive sur le critère de jugement principal et le critère de jugement secondaire, cependant l'effet est de faible amplitude. La tolérance du cocktail de bactériophages anti-<i>P. aeruginosa</i> était acceptable.

3. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION URINAIRE

	Tableau V. Essai clinique dans l'infection urinaire (12)
Titre de l'étude	Essai clinique randomisé, en double aveugle, contrôlé <i>versus</i> placebo dont l'objectif est d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'une administration intra-vésicale de bactériophages dans le traitement des infections urinaires symptomatiques.
Statut de l'essai clinique	En cours, résultats non publiés, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03140085 Début de l'étude : Novembre 2015
Population de l'étude	Patients âgés de 18 ans ou plus, devant subir une résection transurétrale de la prostate par voie endoscopique, présentant une infection des voies urinaires symptomatique définie par : - un ECBU positif ; - une bactériurie $\geq 10^4$ UFC/mL, présence de bactéries uropathogènes : <i>E. coli</i>, <i>Proteus</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Enterococcus</i> ; - les bactéries doivent être sensibles au cocktail de bactériophages, un phagogramme est réalisé avant la randomisation.
Critère de jugement principal	Succès du traitement administré en intra-vésicale pendant 7 jours. Le traitement est considéré comme efficace s'il permet une normalisation des cultures bactériologiques urinaires : absence de bactérie ou bactériurie $< 10^4$ UFC/mL.
Autres critères de jugement	Critère secondaire : évaluation de la tolérance au traitement : suivi des effets indésirables. Critère tertiaire : suivi de l'évolution des symptômes d'HBP ¹ (résidus post-mictionnel, fuites urinaires, nombre de fois où la vessie se vide), évaluation de la douleur à l'aide d'une échelle visuelle analogique, comparaison des résultats du questionnaire « International Prostate Symptom Score » (IPSS) à J0 et à J7
Traitements expérimentaux	Placebo : solution stérile « Pyo bactériophage [®] » : cocktail de 5 bactériophages (<i>E coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus spp</i> , <i>Streptococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp</i>)
Design de l'étude	3 bras, randomisation (1:1:1), tous les patients subiront une résection transurétrale de la prostate par voie endoscopique, un cathéter sus-pubien sera posé : - bras « a » traitement par bactériophages : administration intra-vésicale d'un cocktail de bactériophages ; - bras « b » : contrôle : administration intra-vésicale d'un placebo ; - bras « c » traitement antibiotique : selon la sensibilité de la souche bactérienne en cause, début de l'administration : le jour de la chirurgie. Durée du traitement : 7 jours. Le placebo ou la suspension de bactériophages doivent rester au contact de la vessie pendant 30-60 min. Le cocktail de bactériophages ou le placebo seront administrés via le cathéter sus-pubien 2 fois par jour à compter du premier jour après la chirurgie. Un ECBU est réalisé avant l'inclusion afin de tester la sensibilité de la souche bactérienne aux antibiotiques. Le traitement placebo et la suspension de bactériophages sont administrés en double aveugle. Le traitement antibiotique, quant à lui, est administré en ouvert. Si un patient inclus dans le bras « a » ou « b » présente de signes cliniques et biologiques (CRP > 100 mg/l, fièvre > 38 °C) d'infection systémique au cours de la période de traitement, alors un traitement antibiotique adapté sera introduit. Un traitement antibiotique sera également initié chez les patients présentant une infection urinaire persistante à l'issue des 7 jours de traitement.
Hypothèses	Supériorité de l'efficacité du traitement par bactériophages par rapport au placebo (Nombre de patients nécessaires = 81, puissance 80%) Non-infériorité de l'efficacité traitement par bactériophages par rapport au traitement antibiotique. (Nombre de patients nécessaires = 81, puissance 80%))

¹HBP : hypertrophie bénigne de la prostate

4. ESSAI CLINIQUE CHEZ LE VOLONTAIRE SAIN

Tableau VI. Résultats de l'essai clinique utilisant des bactériophages chez des volontaires sains (8)

Titre de l'étude	Étude monocentrique, randomisée, en double aveugle, en cross-over, contrôlée <i>versus</i> placebo visant à évaluer la sécurité de l'administration de bactériophages par voie orale chez des volontaires sains.
Statut de l'essai clinique	Terminé. L'étude s'est déroulée en Juin 2003 et a duré 1 mois.
Population de l'étude	Volontaires sains adultes âgés de 23 à 54 ans travaillant chez Nestlé®
Objectif de cette étude	L'objectif de cette étude était d'évaluer la sécurité de l'administration orale de bactériophages. Un suivi des effets indésirables, des paramètres biologiques (ALAT/ASAT), de l'apparition d'anticorps anti-bactériophages T4 ainsi que du titre phagique et bactérien dans les selles a été réalisé tout au long de l'étude.
Traitements expérimentaux	le traitement A : suspension de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 = 10^5 PFU/ml ; le traitement B : suspension de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 = 10^3 PFU/ml ; le traitement C : placebo. } Le véhicule était de l'eau minérale.
Design de l'étude	Les sujets ont été randomisés selon les séquences : ABC, BCA et CAB. L'étude a été divisée en 4 périodes de 1 semaine. Semaine 1 : niveau de base, 2 prélèvements de selles ont été réalisés. Semaine 2, semaine 3 et semaine 4 : les sujets ont reçu selon la randomisation, 150 mL du traitement expérimental, par voie orale, 3 fois par jour pendant 2 jours, suivi de 5 jours sans traitement (période de wash-out). Au cours de ces 3 semaines, des prélèvements de selles ont été réalisés 1 fois par jour. Un examen clinique a été effectué par un médecin à J0 et J30. Les volontaires ont reçu des formulaires sur lesquels ils pouvaient signaler tout type d'événement indésirable.
Résultats	Volontaires sains : n=15. Les traitements ont été correctement tolérés, 5 effets indésirables mineurs ont été rapportés. Ils ne sont imputables aux traitements. Les taux sériques des transaminases sont restés conformes aux valeurs normales et aucun anticorps anti-bactériophage <i>E. coli</i> T4 n'a été observé dans le sérum des sujets à la fin de l'étude. A l'issue de la période de suivi aucun bactériophage T4 n'a été retrouvé dans le sérum des sujets. Le titre de bactériophage mesuré dans les selles varie de manière dose dépendante selon l'administration orale de bactériophages : dans le bras B les patients ont reçu une dose totale de bactériophages T4 de 9×10^7 PFU/mL, un titre similaire (10^7 PFU/mL) a été mesuré dans les selles. Ainsi il semble que la préparation de bactériophages reste stable au cours du transit dans le tractus gastro-intestinal. Aucune modification du titre bactérien mesuré dans les selles n'a été observée suite à l'administration orale de bactériophage.
Limites	- Faible nombre de patients n=15 - Il s'agit d'un essai exploratoire. - Il n'est pas possible d'exclure de manière certaine la destruction des bactériophages par le pH acide de l'estomac
Conclusions	Le traitement a été correctement toléré, aucun des volontaires sains n'a présenté d'effets indésirables imputables au traitement, ni d'élévation des marqueurs de cytolysé hépatique, ni même développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage testé. Il s'agit d'un essai exploratoire. Les données collectées lors de cette étude ont été utilisées pour déterminer le schéma de l'essai clinique réalisé chez des enfants (âgés de 6 à 24 mois) présentant une diarrhée aiguë, décrit ci-dessous.

5. ESSAI CLINIQUE DANS L'INFECTION DIGESTIVE

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

Titre de l'étude	Une étude randomisée, prospective, monocentrique, contrôlée <i>versus</i> placebo a été réalisée au Bangladesh chez des enfants (âgés de 6 à 24 mois) présentant une diarrhée aiguë depuis moins de 48h (soit d'apparition récente), avec déshydratation. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité et la sécurité du cocktail de bactériophages T4 par rapport au cocktail Microgen® (coli proteus phages) ou au placebo.
Statut de l'essai clinique	Terminé. Début : Juin 2009 ; fin : Septembre 2011 L'étude a été arrêtée lors de l'analyse intermédiaire des données (N=120).
Population de l'étude	Enfants âgés de 6 à 24 mois présentant : - une diarrhée aiguë d'apparition récente définie par au moins 4 selles/jour au cours des dernières 24h ; - des signes de déshydratations selon les critères définis par OMS. Des analyses microbiologiques et virologiques des selles étaient réalisées avant la randomisation afin de vérifier l'absence de Rotavirus ou de bactéries du genre <i>Vibrio</i> .
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal était la tolérance au traitement par bactériophages évaluée par : l'examen clinique de patients, le suivi des fonctions hépatiques et rénales et des paramètres hématologiques.
Autres critères de jugement	Le critère de jugement secondaire était le titre de bactériophages anti- <i>E. coli</i> et le dénombrement bactérien (<i>E. coli</i> totaux) dans les fèces, la sensibilité des souches <i>E. coli</i> aux bactériophages ainsi que la clairance des <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC) dans les selles. L'objectif <i>in fine</i> étant d'évaluer l'activité <i>in vivo</i> du bactériophage lytique. Enfin le critère d'évaluation tertiaire était l'impact de l'administration de bactériophages par voie orale sur différents paramètres, depuis la randomisation jusqu'à la guérison, tels que : - la quantité de selles produite en g/kg de masse corporelle par jour ; - la fréquence des selles en nombre par jour ; - la volume de soluté de réhydratation nécessaire pour corriger la déshydratation du patient en ml/kg de masse corporelle par jour. La résolution des diarrhées était définie par l'émission des selles moulées pendant 2 périodes consécutives de 6 heures. A noter que si la diarrhée persistait au-delà de 5 jours, le traitement était considéré comme inefficace, et le patient était transféré dans un autre hôpital pour une prise en charge selon le protocole standard.
Traitements expérimentaux	Placebo : NaCl 0,9% Le « T4 phage cocktail » : mélange de 11 bactériophages anti - <i>E. coli</i> T4, le titre de la suspension était $3,6 \times 10^8$ PFU/mL Cocktail Microgen® ColiProteus, le titre de la suspension était $1,4 \times 10^9$ PFU/mL, la composition est détaillée précisément dans une publication (87).
Design de l'étude	2 bras, randomisation par bloc de 6 (1:1:1) : - Bras contrôle : placebo (NaCl 0,9%) ; - Bras traitement : cocktail de bactériophages anti- <i>E. coli</i> T4 ou le cocktail Microgen® ColiProteus.

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

suite	Les 3 traitements de l'étude ont été mélangés à une solution orale de réhydratation, de l'eau minérale et ont été administrés par voie orale à la posologie de 3 fois/jour pendant 4 jours. Période de suivi : une visite était réalisée 21 jours après la première dose de traitement.
Résultats	120 patients ont été inclus : 41 dans le groupe placebo, 40 dans le groupe Microgen[®], 39 dans le groupe bactériophages anti <i>E. coli</i> T4. L'analyse microbiologique des selles des 56 premiers patients a permis de confirmer que 77% présentaient dans leur selles l'agent pathogène <i>E. coli</i>. 1 patient présentait une diarrhée à rotavirus. Des germes tels que <i>Campylobacter jejuni</i> (n=9), <i>Campylobacter coli</i> (n=2), <i>Aeromonas</i> (n=2), <i>Vibrio cholerae</i> (n=2), <i>Salmonella</i> (n=1) et <i>Shigella flexneri</i> (n=1) ont été identifiés chez des patients. La présence de gènes de virulence de la souche <i>E. coli</i> a été recherchée dans les selles de ces 56 patients : des gènes spécifiques à ETEC¹ ont été détectés chez 28 patients ; des gènes spécifiques à EPEC² ont été détectés chez 5 patients, des gènes spécifiques à EAEC³ ont été détectés chez 7 patients. A l'admission les groupes étaient comparables sur les paramètres suivants : durée de la diarrhée, fréquence des selles et des vomissements. Les enfants dont l'analyse microbiologique des selles a permis d'identifier : - des bactéries pathogènes entériques autres que <i>E. Coli</i> ; - aucun agent pathogène ; sont restés dans l'étude et leurs données ont été utilisées pour l'analyse en intention de traiter (ITT). Une analyse en sous-groupe a été réalisée avec les données des patients présentant une infection confirmée à <i>E. coli</i>. <u>Critère de jugement principal (analyse per-protocole)</u> : Aucune différence significative n'a été observée entre les paramètres cliniques et hématologiques mesurés à l'admission et ceux mesurés à l'issue des 4 jours de traitement par bactériophages ou placebo (tests t appariés). Aucune altération de la fonction rénale et hépatique n'a été observée. <u>Critère de jugement secondaire</u> : Le titre et la prévalence des bactériophages anti-<i>E. coli</i> mesurés dans les selles étaient significativement supérieurs chez les patients traités par bactériophages par rapport au groupe placebo. Dans le groupe traitement par bactériophages, aucun patient n'a présenté dans les selles un titre phagique supérieur à celui des différentes préparations de bactériophages administrés. Dans le groupe traitement par bactériophages, il n'a pas été rapporté de différence significative dans le titre phagique mesuré dans les selles selon la sensibilité des souches <i>E. coli</i> aux bactériophages. Ces deux résultats suggèrent un transit passif des bactériophages dans l'intestin, aucune réplication virale significative ne semble avoir eu lieu <i>in vivo</i>. Seul 50% des patients présentaient dans leurs selles, une souche <i>E. coli</i> sensible aux bactériophages administrés lors de l'étude. Le nombre total de bactéries fécales était significativement plus faible chez les patients traités par bactériophages <i>versus</i> les patients traités par placebo (p < 0,001 test de Dumm). Chez les patients présentant une diarrhée à <i>E. coli</i>, cette souche représentait moins de 5% des bactéries fécales totales. Cependant la proportion de <i>E. coli</i> dans les selles était 10 fois plus élevée chez les patients présentant une diarrhée à <i>E.coli</i> comparé à ceux présentant une diarrhée due à un autre germe. Aucune diminution significative des titres ETEC¹ n'a été observée chez les patients traités par bactériophage <i>versus</i> ceux traités par placebo. <u>Critère de jugement tertiaire</u> : Lors de l'analyse intermédiaire, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes lors de la comparaison des paramètres suivants : quantité de selles produite, fréquence des selles, volume de soluté de réhydratation nécessaire pour corriger la déshydratation (P > 0.1 for all comparaisons, t test). Au jour 6, 93%, 88%, 84% des patients traités respectivement par Cocktail T4, Cocktail Microgen[®] et le placebo présentaient une résolution des diarrhées : aucune différence n'a été observée à propos du taux de résolution des diarrhées entre les différents groupes.

ETEC¹ : *E. coli* entérotoxigéniques
EPEC² : *E. coli* entéropathogènes
EAEC³ : *E. coli* entéroaggrégatives

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

suite	L'analyse du microbiote intestinal (ARN 16S) ne montrait pas de perturbation significative des différentes populations bactériennes par rapport aux sujets ayant reçu le placebo.
Limites	- Le profil de tolérance des préparations orales de bactériophages est acceptable. Or lors de diarrhée, l'atteinte de l'intégrité de la muqueuse intestinale peut être à l'origine du passage des endotoxines et des entérotoxines, libérées lors de la lyse bactérienne par les bactériophages, dans la circulation générale. Cette libération massive de toxines peut être à l'origine de sepsis sévère ou autres réactions systémiques graves. Cependant, au cours de la phase de traitement, la faible réplication virale des bactériophages n'a pas permis de lyse bactérienne significative. Ainsi dans ce contexte, il semble difficile de conclure de manière certaine que l'administration per os de bactériophages est réellement dénuée d'effet indésirable. - Les 2 préparations de bactériophages administrées n'ont pas permis une résolution des troubles diarrhéiques. Il convient de rappeler que le critère de jugement principal était la tolérance au traitement, ainsi cet essai n'avait pas été conçu et n'avait pas la puissance statistique nécessaire pour permettre de conclure in fine à une quelconque efficacité du traitement. De plus lors de l'analyse intermédiaire, le nombre de patients inclus était seulement de 120, or il avait été prévu d'inclure 225 patients. - Seulement 60% des patients inclus présentaient dans leur selle une souche <i>E. coli</i> entéropathogènes. Ainsi les auteurs avaient surestimé le nombre de cas de diarrhées infantiles à <i>E. coli</i>. De plus chez les patients présentant une diarrhée à <i>E. coli</i>, cette souche représentait moins de 5% des bactéries fécales totales. Le titre bactérien moyen retrouvé dans les selles était de 10^5 UFC/g de selles, le titre phagique dans les selles était en moyenne de 10^6 PFU/g. Les auteurs avaient estimé que la quantité (« burst size ») moyenne de bactériophage produits à l'identique serait <i>in vivo</i> de l'ordre de 10. Ainsi dans ce contexte, le phénomène d'amplification virale ne pouvait avoir lieu. - Seul 50% des patients présentaient dans leurs selles, une souche <i>E. coli</i> sensible aux bactériophages administrés lors de l'étude. Le cocktail Microgen® dont la composition a été définie selon les données épidémiologiques et phénotypiques russes, ne permettait une couverture optimale des souches bactériennes responsables des diarrhées chez les enfants du Bangladesh. Il en est de même pour le cocktail T4 bactériophages dont la composition avait été définie quelques années auparavant. La conception d'un cocktail est idéalement basée sur des données épidémiologiques (quelles sont les bactéries les plus fréquemment isolées chez les enfants atteints de diarrhées au Bangladesh ?) et sur des données phénotypiques. Il doit être constitué de façon à obtenir la couverture la plus large possible vis-à-vis des souches statistiquement les plus représentées dans un type d'infection donné. Or dans le cas de cet essai, ce n'était pas le cas. - Les 2 préparations de bactériophages ont été administrées sans antiacide. Or l'alcalinisation de l'estomac est un prérequis indispensable à l'administration per os des bactériophages (20). Cependant, il n'était pas possible pour des raisons éthiques d'administrer les bactériophages avec des antiacides, en effet ces derniers augmentent les risques de survenue d'infections nosocomiales. A noter que les enfants ont un pH plus élevé que celui des adultes. Ainsi dans ce contexte, la formulation des préparations de bactériophages a probablement limité l'efficacité du traitement. - Les observations dans les matières fécales reflètent-elles réellement ce qu'il se passe dans l'intestin ? Les infections à <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène et <i>Escherichia coli</i> entéropathogène ont lieu dans les parties supérieures de l'intestin, ainsi des différences qualitatives et quantitatives peuvent exister entre ce qui se passe dans l'intestin et ce qui est mesuré dans les selles. Cependant, un tel échantillonnage est invasif et difficile à justifier d'un point de vue éthique, dans le cas d'une maladie normalement spontanément résolutive chez l'enfant.

Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive (9)

suite	- Plusieurs éléments ont pu limiter les interactions <i>in vivo</i> des bactériophages et des bactéries et pourraient expliquer l'absence de réplication virale : l'augmentation du péristaltisme lors de la diarrhée, la réduction de la diffusion des bactériophages dans la muqueuse intestinale en raison de l'altération de cette dernière...
Conclusions	Aucun évènement indésirable attribuable au traitement par bactériophages n'a été observé. Le phénomène d'amplification virale au niveau du site infectieux n'a pas été observé. L'étude était négative sur le critère de jugement tertiaire. Les résultats précédemment cités peuvent être expliqués : - le spectre global de couverture des cocktails de bactériophages ne permettait pas de couvrir l'ensemble des souches bactériennes responsables de la pathologie préoccupante ; - par une densité bactérienne trop faible pour permettre un amorçage de la multiplication virale. Les auteurs ont souligné qu'il était fondamental de connaître la densité bactérienne au niveau du site infectieux afin de s'assurer que celle-ci est suffisante pour permettre un amorçage de la réplication virale <i>in vivo</i>. Ils ont également indiqué qu'il serait préférable d'administrer des doses de bactériophages plus élevées. Enfin ils ont conclu que des connaissances supplémentaires sur les interactions <i>in vivo</i> entre bactériophages et bactéries étaient nécessaires.

ANNEXE 3

Modalités de contrôle des Matières Premières à Usage Pharmaceutique selon leur circuit d'approvisionnement

Ordre de priorité	Localisation du fournisseur de MPUP	Type d'Etb fournisseur de MPUP	Circuit d'approvisionnement de la MPUP	Liste des documents dont la PUI doit disposer afin de garantir la qualité de la MPUP réceptionnée	Actions devant être réalisées par la PUI
	UE	1	Etablissement Pharmaceutique autorisé (pour la fabrication de spécialités) fournissant une MPUP entrant dans la composition d'une spécialité pharmaceutique et étant de même origine et de même qualité que celle utilisée pour ladite spécialité	Provenant de l'Etablissement de type 1 ou 2 : * Récépissé d'autorisation ou de déclaration auprès de l'ANSM ou de l'autorité compétente de l'Etat Membre concerné * Certificat de conformité aux BPF délivré par l'ANSM ou l'autorité compétente de l'Etat Membre concerné * Certificat d'analyse du lot ⁽¹⁾	Présence d'un Système d'inviolabilité pour chaque contenant Si présence de tous les documents → Vérifier la cohérence entre le contenant et le certificat d'analyse Si absence d'un des documents → Prélèvement + contrôle complet ⁽²⁾ sur chaque lot
		2	Etablissement ayant des activités de : ⇒ fabrication (complète ou partielle ou réalisant divers procédés de division ou de conditionnement) ⇒ distribution (reconditionnement et de réétiquetage)		
				Provenant de l'Etablissement de type 3 : * Récépissé d'autorisation ou de déclaration auprès de l'ANSM ou de l'autorité compétente de l'Etat Membre concerné * Attestation d'inspection Et Provenant de l'Etablissement de type 1 ou 2 : * Certificat de conformité aux BPF * Certificat d'analyse du lot ⁽¹⁾	
			3	Etablissement ayant des activités de ⇒ distributeur / importateur (pas d'activité de reconditionnement ou de ré-étiquetage)	
-	Hors UE	4	Autres fournisseurs		Prélèvement + contrôle complet ⁽²⁾ sur chaque contenant

⁽¹⁾ **Certificat d'analyse de lot**

La substance est-elle à la Pharmacopée Européenne ?

Oui

Non

Existe-t-il un CEP ?

Oui

Non

Tous les contrôles mentionnés dans le CEP doivent être présents sur le C.A. de lot

Les contrôles reportés sur le C.A. sont conformes aux monographies générales (2034) et à la monographie spécifique de la MPUP.

Les PUI doivent vérifier que les contrôles mentionnés dans les référentiels équivalents et dans les monographies générales (2034) sont reportés dans le CA du lot de MPUP.

⁽²⁾ **Contrôle complet :**

Contrôle selon la Pharmacopée Européenne ou française (monographies générales et spécifiques). Pour les MPUP non inscrites à la Ph. Eur. ou la Ph. fr, des spécifications et des méthodes d'analyses validées doivent être mises en place pour contrôler les impuretés potentielles (Pharmacopée d'un autre Etat européen ou d'un Pays tiers, bibliographie).

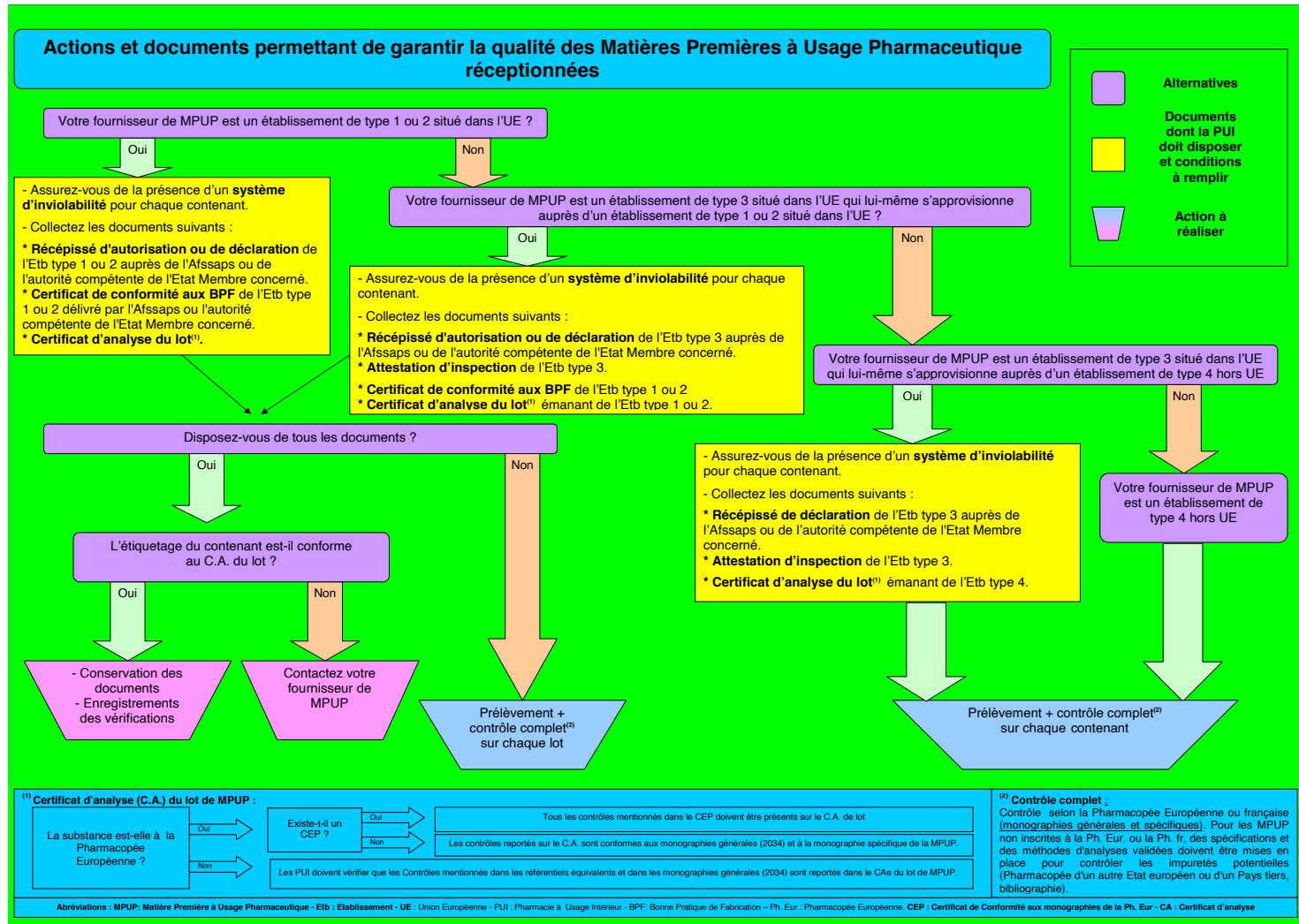
Certificat BPF

Attention ne pas confondre le **Certificat BPF** (délivré aux fabricants et distributeurs de substances actives avec activité de reconditionnement/ré-étiquetage) et l'**Attestation d'inspection** (délivrée aux distributeurs de MPUP, fabricants d'excipients et d'éléments de mise en forme).

Abréviations : MPUP: Matière Première à Usage Pharmaceutique - Etb : Etablissement - UE : Union Européenne - PUI : Pharmacie à Usage Intérieur - BPF: Bonne Pratique de Fabrication - Ph. Eur : Pharmacopée Européenne. CEP : Certificat de Conformité aux monographies de la Ph. Eur - CA : Certificat d'analyse

ANNEXE 4

Actions et documents permettant de garantir la qualité des Matières Premières à Usage Pharmaceutique



ANNEXE 5

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Les données sont issues de la 9^{ème} édition de la Pharmacopée européenne. Elles ne sont pas spécifiques aux préparations de bactériophages. Elles sont applicables à tous les principes actifs (origine chimiques et biologiques).

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration											
Voie d'administration		Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Critère d'acceptation de la qualité microbiologique des préparations non stériles Selon le Chapitre générale 5.1.4 de la Pharmacopée européenne	DGAT ¹ = 10 ² DMLT ² = 10 ¹	NC	✕ Si atteinte mineure de la peau	✕	NC	✕	✕		Les préparations présentées en récipients multidoses peuvent contenir un conservateur antimicrobien approprié à concentration convenable, à moins que la préparation elle-même ne possède des propriétés antimicrobiennes adéquates.	✕	NC
	DGAT ¹ = 10 ³ DMLT ² = 10 ²						✕				
	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL)		✕ Si atteinte mineure de la peau	✕		✕	✕				
	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL)		✕ Si atteinte mineure de la peau	✕		✕	✕				
	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)									✕	
	Absence de bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaries (1 g ou 1 mL)					✕					

¹DGAT en UFC/g ou UFC/mL = Dénombrement des germes aérobies totaux

²DMLT en UFC/g ou UFC/mL = Dénombrement des moisissures/levures totales

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Voie d'administration	Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Suite Exigence de stérilité selon : - la Monographie 2.6.1 de la Pharmacopée européenne - le Chapitre générale 5.1.1 de la Pharmacopée européenne	×	×	NC	×	×	×	NC	× Sont concernées les préparations présentées en récipients : - multidoses ne contenant pas de conservateur antimicrobien et ne possédant pas des propriétés antimicrobiennes adéquates ; - en récipients unidoses et ne contenant pas de conservateur antimicrobien.	NC	×
Exigences relative à la concentration en endotoxines et critères d'acceptabilité Monographie 2.6.14 de la Pharmacopée européenne	[concentration en endotoxines] < à 5 UI ³ /kg (poids corporel du patient)/h (si perfusion > 1 heure).	NC	NC	[concentration en endotoxines] < à 0.5 UI ³ /mL	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Les préparations auxquelles aucune méthode validée de détection des endotoxines bactériennes ne peut être appliquée satisfont à l'essai des pyrogènes. Monographie 2.6.8 de la Pharmacopée européenne	×	NC	NC	×	NC	NC	NC	NC	NC	NC

³UI = Unité internationale

Exigences relatives à la qualité pharmaceutique de la préparation en fonction de la voie d'administration

Voie d'administration	Voie intraveineuse	Préparation pour application cutanée	Préparation pour inhalation	Préparation pour irrigation	Voie nasale	Voie auriculaire	Voie rectale	Préparation pour nébulisation	Voie orale	Préparation ophtalmique
Suite Autres exigences spécifiques en lien avec la voie d'administration	Les solutions devront : - satisfaire à l'essai de contamination particulière : particules non visibles (Monographie 2.9.19 de la Pharmacopée européenne) ; - être limpides ; - pratiquement exemptes de particules.	NC	NC	NC	NC	Les préparations auriculaires destinées à être appliquées sur une oreille lésée, (perforation du tympan,) ou avant une intervention chirurgicale, sont stériles et, sauf exception justifiée et autorisée, exemptes de conservateurs antimicrobiens, et conditionnées en récipients unidoses.	NC	Si récipients multidoses, sans conservateur antimicrobien et si la préparation ne possède pas des propriétés antimicrobiennes adéquates : conditionnement dans des récipients empêchant la contamination microbienne du contenu au cours de la conservation et de l'utilisation.	NC	Les préparations devront être : - pratiquement limpide - pratiquement exemptes de particules Un essai visant à évaluer la taille des particules doit être réalisé (mode opératoire chapitre 7 de la Pharmacopée européenne).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Groupe de risque : du plus faible (1) au plus important (4).....	19
Tableau II. Précautions d'habillage lors de la réalisation de préparations stériles.....	41
Tableau III. Résultats de l'essai clinique Phagoburn.....	62
Tableau IV. Résultats de l'essai clinique dans l'infection ORL chronique.....	66
Tableau V. Essai clinique dans l'infection urinaire.....	68
Tableau VI. Résultats de l'essai clinique utilisant des bactériophages chez des volontaires sains.....	69
Tableau VII. Résultats de l'essai clinique dans l'infection digestive.....	70

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du bactériophage T4	9
Figure 2. Les principaux cycles infectieux des bactériophages	10
Figure 3. Aspect de la technique des « sur-spots ».....	26
Figure 4. Exemple de titration de 2 solutions de bactériophage 536-P1 et 536-P7.....	27
Figure 5. Cinétique de lyse d'une souche X par les bactériophages A, B et C.....	28
Figure 6. Estimation des activités biocides des principales substances	42