POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Stratégies pour la stabilisation de bactériophages contenus dans des pansements biodégradables pour traiter les infections à résistances multiples aux antibiotiques

HADJER BENAMMAR AMMAR

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Décembre 2019

© Hadjer Benammar Ammar, 2019.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Stratégies pour la stabilisation de bactériophages contenus dans des pansements biodégradables pour traiter les infections à résistances multiples aux antibiotiques

présenté par **Hadjer BENAMMAR AMMAR**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Delphine PÉRIÉ-CURNIER, présidente
L'Hocine YAHIA, membre et directeur de recherche
Nancy TAWIL, membre et codirectrice de recherche
George SZATMARI, membre

DÉDICACE

Avec reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soit les termes enlacés, je n'arriverais jamais à leur exprimer ma gratitude et mon amour sincère.

À ma chère mère,

À mon cher père,

À vous mes parents, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point vous remercier comme il se doit. Votre bienveillance me guide, votre affection me couvre et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les obstacles de la vie et atteindre mes objectifs.

À mon cher frère Ismail

À ma chère sœur Sarah et son mari Morad

Qui ont toujours été là pour me soutenir moralement et me donner des conseils durant mon processus.

À mes grands-parents Yamina et El Hachemi

Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard pour mon succès.

À la mémoire de ma grande mère Kamela

Qui nous a quittés tôt

À ma famille,

Qui leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

À ma belle famille

Fatima, Hayet, Nawel et leurs maris

Qui m'ont soutenu et encouragé durant cette période difficile.

À mes amies Christelle et Ikram

Qui m'ont donné la force avec leur présence, soutien et amour

Dédicace spéciale à mon précieux mari,

Sans qui, ma vie de rêve ne sera jamais réelle, pleine de respect, de confiance et beaucoup d'amour

À tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon projet et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais dans un premier temps remercier, mon directeur de recherche Monsieur L'Hocine Yahia, professeur à l'école Polytechnique de Montréal, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je remercie également Madame Nancy Tawil, Vice-présidente de la division de recherche de Phagelux Inc. Montréal et professeur associée à l'école Polytechnique de Montréal, ma codirectrice de recherche, pour le temps qu'elle a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche. Son exigence m'a grandement stimulé.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes,

Madame Delphine Périé-Curnier, professeur à l'école Polytechnique de Montréal, pour avoir accepté d'honorer mon mémoire étant présidente jury.

Monsieur George Szatmari, professeur à l'université de Montréal, pour son acceptation d'être membre de jury de mon mémoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères, À Madame Amal Bennani, agente aux dossiers étudiants, pour son encouragement, ses conseils professionnels et son soutien.

Je remercie également toute l'équipe industrielle de Phagelux.Inc au CNRC et les intervenants professionnels responsables de ma formation Iness Hammami et Eric Habib, pour avoir assuré la partie expérimentale avec leurs conseils d'experts.

RÉSUMÉ

En raison du problème croissant des bactéries résistantes aux antibiotiques émergeant dans le monde, la phagothérapie a attiré les efforts des scientifiques et l'intérêt public. C'est une thérapie par les bactériophages, communément appelés phages. Ce sont des virus qui infectent et se répliquent à l'intérieur des hôtes bactériens spécifiques, provoquant une bactériolyse. Bien que les recherches sur les phages et les expérimentations soient de plus en plus populaires, il manque toujours des informations sur les préparations pharmaceutiques et les conditions nécessaires au maintien de l'efficacité du traitement par phages. En général, les préparations de bactériophages appliquées à des fins thérapeutiques sont produites sous forme liquide, et la durée de stockage de ces produits à 4 °C est considérée comme limitée à un an. C'est alors que la stabilité à moyen et à long terme implique principalement l'utilisation de bactériophages lyophilisés. D'où l'objectif de ce projet d'optimiser l'application potentielle du procédé de lyophilisation dans le traitement commercial du cocktail SPK, actif contre les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* en présence de différents stabilisants. Suite à une série de tests, le Tréhalose, le Saccharose et le Mannitol, le Maltose, le PEG600 et la combinaison Pullulant/ Tréhalose nous ont permis de préserver la stabilité de nos phages avec une perte de moins d'un log après lyophilisation et moins de 2 logs après une année de stockage. L'application de notre cocktail SPK dans des patchs, a démontré qu'il résiste assez bien à l'encapsulation dans des matrices biodégradables et maintien sa stabilité avec une durée de relargage acceptable, pour le traitement des plaies de brûlures de peau infectées.

Mots clés : stabilité, lyophilisation, phage, bactériophage, relargage, patch, excipient, lyoprotectant, cryoprotectant.

ABSTRACT

Due to the growing problem of antibiotic-resistant bacteria emerging around the world, phage therapy has attracted scientists' efforts and the public interest. While phage research has been growing more popular, there is still a lack of information on pharmaceutical preparations and conditions for maintaining effectiveness for phage therapy.

In general, phage preparations applied for therapeutic purposes are produced in liquid form, and the shelf life of these products at 4 °C is limited to one year. Medium and long-term stability mainly involve the use of lyophilized bacteriophages. Lyophilization methods vary significantly in both stabilizers and lyophilization cycles. Hence, the objective of this project to optimize the potential application of the lyophilisation process in the commercial treatment of SPK cocktail, active against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria, in presence of different stabilizers. Following a series of tests, Trehalose, Sucrose, Mannitol, Maltose, PEG600 and the combination Pullulant/ Trehalose allowed us to preserve the stability of our phages with a loss of less than one log directly after lyophilisation and fewer than 2 logs after a year of storage. The application of the SPK cocktail in patches, has demonstrated that it is quite resistant to encapsulation in biodegradable matrices and maintains its stability with an acceptable release time, for the treatment of infected skin burn wounds.

Key words: stability, lyophilization, phage, bacteriophage, release, patch, excipient, lyoprotectant, cryoprotectant.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ V

ABSTRACT VI

TABLE DES MATIÈRES VII

LISTE DES TABLEAUX IX

LISTE DES FIGURES X

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XIII

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1 Introduction générale et problématique : 1

1.2 Objectif principal 6

1.3 Objectifs spécifiques 7

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 8

2.1 Cibles bactériennes 8

2.1.1 *Le staphylocoque doré (Staphylococcus aureus)* 8

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* 9

2.1.3 *Klebsiella pneumoniae* 10

2.2 Les bactériophages 11

2.2.1 Caractéristiques et structure 13

2.2.2 Les familles de bactériophages 14

2.2.3 Les cycles phagiques 15

2.2.4 Le cocktail SPK 17

2.3 Processus de lyophilisation 18

2.3.1 Théorie de la lyophilisation 18
2.3.2 Le lyophilisateur 20
2.3.3 Importance de la formulation en lyophilisation 21
2.3.4 Qualité finale du lyophilisat 24
2.4 Les patchs transdermiques (système de relargage) 25
2.4.1 Poly Ester Amide Urée (PEAU) 26
CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODOLOGIE 27
3.1 Matériels 27
3.2 Méthodologie 28
3.2.1 Préparation des milieux de cultures 28
3.2.2 Titration 28
3.2.3 Préparation des formulations et cycles de lyophilisation 29
3.2.4 Les cycles de lyophilisation 30
3.2.5 Les patches à base de bactériophages lyophilisés 32
3.2.6 Analyses statistiques 34
CHAPITRE 4 RÉSULTATS 35
4.1 Sélection des formulations 35
4.2 Comparaison des cycles de lyophilisation 40
4.3 Application des phages lyophilisés dans des patches 42
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE 62
5.1 Sélection des formulations et comparaison des cycles de lyophilisation 62
5.2 Application des phages lyophilisés dans des patches 67
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 69
RÉFÉRENCES 72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Tableau comparatif entre quatre différentes approches alternatives aux antibiotiques 3

Tableau 2.1 Classification des bactériophages d'après Ackermann [78] 15

Tableau 3.1 Tableau représentatif des formulations 30

Tableau 3.2 Tableaux résumant les cycles de lyophilisation P1, P2, P3 et P4 32

Tableau 3.3 Tableau représentatif des formulations de chaque patch 33

Tableau 4.1 Tableau récapitulatif des résultats des formulations et des cycles de lyophilisation . 41

Tableau 4.2 Tableau récapitulatif des résultats des patchs 61

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure du bactériophage T4, spécifique de la bactérie *Escherichia coli* 13

Figure 2.2 Les deux types de cycles (lytique et lysogénique) des bactériophages (lytiques, tempérés) [76] 17

Figure 2.3 Schéma explicatif du processus de lyophilisation 19

Figure 2.4 Lyophilisateur pilote SMH 45 USIFROID (lagep) [83] 21

Figure 2.5 les deux blocs compris dans le polymère PEAU à une répartition aléatoire [94]. 26

Figure 3.1 Schéma explicatif de la méthode de Titration 29

Figure 4.1 L'effet du TMN, Saccharose et du Tréhalose sur le cocktail SPK en utilisant les cycles de lyophilisation P2 et P1. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).....35

Figure 4.2 L'effet du Pullulant+ Tréhalose, HPMC, PEG6000, Mannitol et du Saccharose sur le cocktail SPK en utilisant le cycle de lyophilisation P3. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 37

Figure 4.3 L'effet du Pullulant + Tréhalose, Glucose et du Maltose sur le cocktail SPK en utilisant le cycle de lyophilisation P4. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). ND : valeurs non définies 38

Figure 4.4 L'effet des cycles de lyophilisation P3 et P4 sur le cocktail SPK en utilisant la formulation 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 40

Figure 4.5 Le relargage du patch SPK avec 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 42

Figure 4.6 Le relargage du patch SPK avec 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 43

Figure 4.7 Relargage cumulé du patch SPK avec 11,1% pullulant + 0,56M tréhalose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 44

Figure 4.8 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 45

Figure 4.9 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose se à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 45

Figure 4.10 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).....47

Figure 4.11 Le relargage du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000 à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 48

Figure 4.12 Le relargage du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000 à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 48

Figure 4.13 Relargage cumulé du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 49

Figure 4.14 Le relargage du patch SPK avec 0,5M mannitol à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 50

Figure 4.15 Le relargage du patch SPK avec 0,5M mannitol à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 51

Figure 4.16 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,5M mannitol. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).....52

Figure 4.17 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000 à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 53

Figure 4.18 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000 à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 53

Figure 4.19 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 54

Figure 4.20 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).....55

Figure 4.21 Le relargage du patch SPK avec saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 56

Figure 4.22 Relargage cumulé du patch SPK avec saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 57

Figure 4.23 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 58

Figure 4.24 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 58

Figure 4.25 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). 60

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
DCM	*Dichlorométhane*
XRD	X-ray diffraction
DSC	Differential scanning calorimetry
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FDA	Food and Drug Administration
HPMC	hydroxypropylméthylcellulose
KP	*Klebsiella pneumoniae*
DO	Densité Optique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PEAU	Poly Ester Amide Urée
PEG	Polyéthylène Glycol
pfu/ml	unités formant des plages par ml
PsA	*Pseudomonas aeruginosa*
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SaA	*Staphylococcus aureus*
SPK cocktail	*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* cocktail
TDDS	système de délivrance de médicaments transdermiques
TEM	Transmission Electron Microscopy
Tg	glass transition temperature
TGA	Thermal Gravimetric Analysis
TMN	Tris HCl-$MgSO_4$-NaCl
TSA	Tryptic Soy Broth Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Introduction générale et problématique :

La médecine moderne a connu de grandes et importantes avancées, parmi lesquelles on s'intéressera à la découverte d'antibiotiques et le contrôle subséquent des infections bactériennes.

Cependant, la chimiothérapie, la chirurgie et la transplantation dépendent fortement du contrôle des infections bactériennes [1, 2]. L'utilisation des antibiotiques contre une vague panoplie de bactéries fait d'eux des agents bioactifs de choix sans avoir besoin de caractériser l'agent bactérien responsable de l'infection. En revanche, l'utilisation abusive de cet avantage a entraîné un nouveau défi plus important qui est l'émergence d'une résistance bactérienne aux antibiotiques [3]. Ce phénomène a fait perdre l'efficacité d'importants antibiotiques tels que les tétracyclines, céphalosporines aminosides et macrolides [2], sans exclure les céphalosporines de troisième génération, les carbapénèmes et les fluoroquinolones [4]. De plus, son impact est menaçant pour la santé publique [5] associé par des échecs des traitements, une morbidité et des coûts liés aux soins de santé accrus, jusqu'à même, une mortalité [3].

Pendant une vingtaine d'années, depuis 1940, le marché des antibiotiques a connu plus de 20 nouvelles classes. Après 1962, seulement deux autres classes d'antibiotiques ont vu le jour [6, 7]. Dernièrement, un nouvel antibiotique a été approuvé par la FDA contre les bactéries de *pneumonia* [8].

Coates et al. estiment que pour contrôler le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques, 20 nouvelles classes d'antibiotiques sont nécessaires en urgence [9]. Aussi, l'OMS, a souligné que la résistance aux antimicrobiens est l'une de ses grandes priorités. Pour ce faire, elle a réuni les experts sur cette question au sein d'un nouveau groupe sur les initiatives stratégiques [10].

En parallèle, les exigences réglementaires, rendues plus restrictives, ont alourdi les coûts de développement des médicaments ; De plus, les compagnies pharmaceutiques s'orientent plus vers les solutions alternatives aux antibiotiques qui rapportent plus de bénéfice [9].

Cependant, Czaplewski et al. s'attendent à une solution à long terme comme alternative aux antibiotiques afin de lutter contre les résistances bactériennes. Différentes approches sont définies incluant les anticorps, les probiotiques, les vaccins ainsi que les bactériophages, représentés sur le tableau 1.1, qui fait appel à des efforts internationaux pour soutenir la validation de ces solutions d'avenir [11].

Tableau 1.1 Tableau comparatif entre quatre différentes approches alternatives aux antibiotiques

Approches alternatives aux antibiotiques	Avantages	Inconvénients	Les références
Les anticorps	• Inactivation de l'agent pathogène (inhibition) • Réduction du nombre de bactéries à Gram + et/ou -	• Production aléatoire et limitée	[11-14]
Les probiotiques	• Régulation d'infections • Moduler le système immunitaire • Prévention de la translocation bactérienne	• Conditions de fabrication non standards • Utilisation restreinte (infections gastro-intestinales, peau, nombril,poumons, oreilles et organes génitaux)	[15-17]
Les vaccins	• Prévention de développement d'infections	• Non efficaces sur de nouvelles souches de bactéries résistantes (mise au point de nouveaux vaccins)	[11, 18, 19]
Les bactériophages	• Très spécifiques (une seule espèce bactérienne ou même limité à certaines souches de l'espèce bactérienne) • Cocktail de phages pour un large spectre de bactéries • Procédé industriel rapide et peu coûteux pour la production • Bactérie ciblée par le phage est connue ou supposée • Sécurité du traitement • Capacité de multiplication.	• Instabilité lors d'un stockage à moyen et long terme à l'état liquide • Résistance bactérienne aux phages par coévolution	[1, 20-22]

La phagothérapie, ou encore la thérapie par les phages, a repris naissance depuis l'apparition des résistances bactériennes aux antibiotiques. Ce traitement alternatif est devenu le centre d'intérêt des scientifiques et du public. Toutefois, malgré le nombre élevé des recherches et d'expérimentations allouées à ces virus [20], les formulations pharmaceutiques et les modalités de préserver les phages efficacement ont été très peu étudiées.

Les protéines, incluant les bactériophages, se font dénaturés par des facteurs auxquels ils sont sensibles tels que l'exposition aux solvants, les températures élevées, le pH, les contraintes mécaniques au cours de la formulation [1, 23]. Comme les protéines en général, les bactériophages perdent leur stabilité après une certaine période de stockage. C'est alors que les chercheurs en formulations mènent un combat pour prolonger la longévité des thérapies à base de protéines [24, 25].

Majoritairement, la forme la plus répandue des préparations médicamenteuses des phages est liquide. Cependant, sa durée de stockage à 4°C est estimée à un maximum d'un an [26]. Aussi, le maintien de ces formulations au froid est coûteux surtout dans des régions isolées des pays en voie de développement [25] et l'espace dédié à cet effet est limité [27].

Plusieurs approches ont connu le jour depuis peu, citons l'intégration des phages dans des polymères biodégradables [28], l'encapsulation [29] sans s'abstenir des aérosols [30]. Notamment, ces apparitions nécessitent l'utilisation des phages lyophilisés pour prolonger la durée de vie du produit final avec une activité acceptable des bactériophages [26]. Les méthodes de lyophilisation diffèrent sur le plan des stabilisants et additifs utilisés ainsi que le protocole appliqué. Depuis plusieurs années, les chercheurs œuvrent à optimiser la lyophilisation des phages passant par plusieurs formulations, la température étant l'un des principaux critères sur lequel se basaient la plupart des études. La sensibilité des phages à la congélation était signalée dès 1925 [31]. Depuis

lors, des recherches ont été effectuées sur l'effet alternatif de la congélation et la décongélation des phages par Sanderson [31] et Rivers [32]. Des expérimentations appliquées sur l'effet du gel et du froid pour un stockage à des températures entre 4 et -70 °C sur une multitude de phages ont aussi fait l'objet de plusieurs études [33, 34]. La même année, la congélation des phages dans l'azote liquide à -196 °C était présentée par Clark, Horneland et Klein [35], deux ans plus tard par Mayle et Kempf [36]. A partir des années 70, Davies et al. commençaient à s'intéresser au stockage à une température ambiante [37]; tandis que Shapira, Kohn et Zierdt leur stockage se faisait à -20°C après lyophilisation [38, 39].

En 2004, Ackermann et al. reprennent une série d'expériences pour la préservation des bactériophages à long terme [40]. Suivis par [21, 29, 41] et [42] qui se sont intéressés aux stabilisants et les additifs ajoutés aux formulations des phages.

Plusieurs études ont montré que la formulation liquide des phages était améliorée en utilisant la lyophilisation [26], le séchage par atomisation [43-45] et pulvérisation-lyophilisation [43]. D'autre part, des études ont prouvé que les formulations de protéines lyophilisées ont le potentiel d'offrir un stockage facile, transport et administration avec une longue durée de conservation par rapport aux formulations liquides [46]. En règle générale la lyophilisation se démarque comme processus de choix pour la préservation et le stockage des produits biologiques. Par contre, l'information sur les agents stabilisants utilisés pour la lyophilisation des bactériophages reste restreinte, le lyoprotecteur le plus couramment cité pour cet effet est le lait écrémé [47, 48]. Étant donné que les phages sont principalement constitués de protéines de capside encapsulant leur matériel génétique, il est raisonnable de formuler des phages avec des stratégies de formulation similaires appliquées aux protéines thérapeutiques [49].

De plus, à l'instar des protéines, les phages peuvent être formulés avec des excipients en poudre pour améliorer la stabilité au stockage. Généralement, différents sucres [25, 41, 50] et des polymères [41, 50, 51], tels que le tréhalose, le saccharose, le mannitol [26, 47] et le poly éthylène glycol (PEG) [52], sont utilisés pour stabiliser les formulations des bactériophages en lyophilisation.

Étant donné qu'il est possible de stabiliser les bactériophages par lyophilisation, il faut primordialement connaître ses phages comme suggérés par [40] et [22] et sélectionner les additifs adéquats pour les formulations.

En effet, la lyophilisation des bactériophages est l'une des deux principales solutions pour surmonter la barrière d'instabilité. De plus leur intégration dans des patches biodégradables avec une durée de vie acceptable, facilitera leur utilisation pour les applications cliniques.

1.2 Objectif principal

L'objectif principal de ce projet est de stabiliser des cocktails de bactériophages, issus des hôtes bactériennes suivantes : *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae,* par la méthode de lyophilisation pour les intégrer dans des matrices de polymères biodégradables à des fins thérapeutiques contre les infections bactériennes en utilisant ces patchs transdermiques.

1.3 Objectifs spécifiques

Notre projet de maîtrise traite les objectifs spécifiques suivants : a) sélection des formulations appropriées au cocktail de bactériophages, le critère du choix est la perte de moins d'un log du titre initial, directement après lyophilisation. b) Optimiser un protocole de lyophilisation adéquat aux formulations, pour une stabilité à moyen et long terme. c) Suivie de la stabilité de l'activité lytique des échantillons lyophilisés sur une année de stockage à une température de 4°C. d) Conception des patchs à base du cocktail lyophilisé pour un effet de relargage et suivi de leur stabilité sur 6 mois de stockage à 4°C et 26°C.

Ce mémoire est organisé en six chapitres. Le premier chapitre est une introduction générale qui présente le contexte clinique, un aperçu des études effectuées à date sur la stabilisation des protéines en général et les bactériophages en particulier incluant la problématique et les objectifs de ce projet. Le chapitre 2, est une revue de littérature assemblant les bactéries cibles résistantes aux antibiotiques et leurs effets, les bactériophages, le processus de lyophilisation et ses caractéristiques et un aperçu sur les patchs et le système de relargage. Le chapitre 3, « Matériels et méthodes » introduit les principaux matériels et méthodologie utilisés pour la réalisation des objectifs. Le chapitre 4 et 5, « Résultats » et « discussion générale » présentent les résultats obtenus et les discussions concernant la stabilité du cocktail de bactériophages après lyophilisation ainsi que le relargage des patchs à base de phages. Pour finir, la conclusion et les recommandations sont présentés dans le dernier chapitre.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Cibles bactériennes

En règle générale, quand les bactéries perturbent le fonctionnement de l'organisme hôte, elles deviennent pathogènes. Un pathogène opportuniste infecte plus les individus affaiblis ou atteints par d'autres maladies. Plusieurs agents pathogènes sont rendus résistants aux médicaments. Nous citerons ici les bactéries les plus problématiques rencontrées à ce jour en milieu hospitalier. Pour le groupe à Gram positif nous avons: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et le *Streptococcus pneumoniae* multirésistant. Pour l'autre classe de bactéries à Gram négatif, nous citons : *l'Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants [53-55].

Sous critères de dangerosité, d'omniprésence et d'efficacité de phagothérapie, trois bactéries ont été sélectionnées comme cible pour façonner les cocktails de phages expérimentaux. Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae*. Chaque bactérie est présentée avec ses caractéristiques et une illustration d'une contamination documentée.

2.1.1 *Le staphylocoque doré (Staphylococcus aureus)*

Dans le genre *Staphylococcus, Aureus* est l'espèce la plus pathogène [56]. *S. aureus* est une bactérie à Gram-positif ayant l'apparence de petites grappes de raisin, dont les colonies prennent une couleur dorée, d'où son nom (*Staphylo* : grappe, *kokkus* : baie, *aureus* : doré). Cette bactérie, découverte par Sir Alexander Ogston en 1880 à Aberdeen (Écosse) [57], se retrouve chez l'homme principalement dans les muqueuses des voies respiratoires ainsi que sur la peau. Environ 20% des gens sont des porteurs permanents de *S. aureus*, et jusqu'à 60% des gens en sont des porteurs intermittents et les 20% restantes sont allouées aux non porteurs de cette bactérie [58]; qui est donc

commensale chez certains humains. *S. aureus* est également présente chez l'animal et possède une excellente capacité à survivre sur des surfaces inertes [59].

S. aureus en plus d'être une bactérie commensale, est aussi un pathogène opportuniste. Inoffensif sur la peau, ce pathogène peut aussi s'infiltrer sous l'épithélium et provoquer diverses infections locales sous la forme de furoncles, boutons, cellulite et autres infections mineures ou majeures de la peau. Le *S. aureus* est aussi à l'origine de plusieurs infections de blessures. Dans les cas où ce pathogène pénètre le système sanguin, il peut se répartir à une grande vitesse dans le corps humain et entraîner des complications graves, comme un choc septique [60]. Non traitées, ces infections sont souvent mortelles.

S. aureus est une bactérie anaérobie, son développement se fait bien sur les milieux de bases. Ses conditions de cultures nécessitent une température de 37 °C pour une croissance optimale, un pH 7 et se développe à de fortes concentrations de NaCl. Donc cette bactérie est majoritairement responsable d'un nombre élevé d'infections nosocomiales. La résistance aux plusieurs antibiotiques en fait du *S. aureus* une cible prioritaire pour des applications de phagothérapie [61].

2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) est une bactérie à Gram négatif de 1 à 5 µm de long. Découverte en 1862 par Luke sur des plaies infectées, ce pathogène n'a été isolé avec succès qu'en 1882 pour la première fois par le Docteur Gessard qui lui a donné le nom de *Bacillus pyocyaneus* [62].

Pseudomonas aeruginosa, un pathogène opportuniste et très important, demeure dans plusieurs environnements passant par les plantes, les animaux jusqu'aux êtres humains. *P. aeruginosa* a une

capacité de survivre en présence nutritionnelle minimale et à endurer différentes conditions physiques ce qui lui permet de subsister à la fois en milieu communautaire et à l'hôpital [55].

L'optimisation des résultats cliniques nécessite une sélection adéquate d'antibiotique afin d'éliminer le pathogène *P. aeruginosa*. Ce dernier révèle un problème thérapeutique en ce qui concerne les infections nosocomiales et celles acquises dans la communauté [63, 64]. Toutefois, ça devient complexe pour choisir l'antibiotique le plus efficace contre le *P. aeruginosa* qui a développé une résistance à de multiples classes d'agents antibactériens, même en plein traitement d'une infection. La résistance de *P. aeruginosa* aux antibactériens peut se développer soit par une acquisition génétique, ou par mutation. L'une ou l'autre des deux stratégies de développement de résistance aux médicaments affectent amplement les options thérapeutiques pour le traitement des infections aiguës [55]. Ce qui fait que le processus de résistance aux antibiotiques du *P. aeruginosa* est un processus génétiquement acquis [65].

Quoi que, ce pathogène touche plus les patients atteints de mucoviscidose et attaque aussi les poumons. Dans des situations telles que l'atteinte de la peau, une application directe des bactériophages est recommandée [61].

2.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Friedlander, le premier nom donné à *Klebsiella pneumoniae* vers la fin du 19ème siècle quand elle a été isolée pour la première fois [66]. Il s'agit d'une bactérie à Gram-négative qui s'établit dans l'environnement, passant par le sol, les eaux de surface y compris l'eau potable, ainsi que sur des dispositifs médicaux [67, 68]. *K. pneumoniae*, est connue par sa facilité de coloniser les surfaces des muqueuses humaines, surtout l'oropharynx et le tractus gastro-intestinal; c'est dans ces parties du corps humain où sa gravité est considérée comme bénigne [67]. Dernièrement, à l'instar du nombre élevé des infections mortelles causées par *K. pneumoniae* et les échecs des traitements

efficaces, cette bactérie est qualifiée d'agent infectieux. L'apparition des souches de *K. pneumoniae* dotées de nouvelles caractéristiques génétiques, donnant naissance à des pathogènes hypervirulants (HV) ou résistants aux antibiotiques, fait l'objet d'une grande inquiétude dans le domaine de la santé [69].

K.pneumoniae est un agent pathogène opportuniste qui cause par estimation entre 4 et 8% des infections bactériennes nosocomiales [70]. Sauf que, les isolats de *K. pneumoniae* deviennent de plus en plus résistants à un large éventail d'agents antimicrobiens [71].

2.2 Les bactériophages

En 1917, le franco-canadien Félix D'Hérelle a observé des plages claires au niveau d'une culture bactérienne manipulée sur de la gélose. Cependant, son hypothèse révélait que ces plages concordaient à une lyse bactérienne causée par un agent méconnu et il lui a attribué le nom de « microbe filtrant » [72]. Bien avant, en 1915, Frederick Twort a découvert ces virus de bactéries. Par contre, lui a supposé que ces plages étaient d'origine chimique [73]. Cependant, l'ère d'un « microbe tueur de microbes » débute par la publication séminale de Félix D'Hérelle, qui lui attribue le nom de bactériophage et s'est concentré sur son isolation [74]. Le premier traitement par phages, qui a connu un grand succès, a été administré à un enfant atteint de dysenterie bacillaire hospitalisé à l'hôpital Necker de paris en 1919 [75]. C'est donc, sur ces entrefaites que la phagothérapie a surgi [76].

Malgré la méconnaissance des bactériophages, leur présence couvre une importante biomasse de la planète; on en compte entre 10^{30} et 10^{32} ce qui est considéré comme dix à cent fois plus que de bactéries. On dénombre en moyenne 10^{7} phages par ml dans les milieux liquides et jusqu'à 10^{9}

dans les sédiments, mesurant en général entre 20 et 300 nm. Leur apparence sur terre fut avec celle des premières bactéries, ils sont d'une importance considérable [76].

Dans le monde des virus, les bactériophages sont considérés comme le plus grand groupe connu. Ce groupe se bifurque en deux classes, les phages lytiques et les phages tempérés. Une faible section, entre 10 et 20% des bactériophages est représentée par les tempérés. Ils sont très populaires, favorisés par les chercheurs dans la réalisation des outils génétiques pour implanter des gènes à l'intérieur des bactéries, et par la suite, pouvoir modifier le génome ce qui permet le développement de molécules par la bactérie. Par contre, il faut garantir leur absence dans les préparations à but thérapeutiques pour leur dangerosité envers les patients. D'autre part, les phages lytiques constituent la très grande majorité des phages. Leur représentant le plus connu est sans doute le phage T4, infectant *Escherichia coli* [61, 76].

Il existe une grande variété des bactériophages dans l'environnement, chaque phage est spécifique à une bactérie hôte, ce qui fait qu'ils couvrent toutes les bactéries. De ce fait, la création des cocktails de bactériophages, facile et efficace, augmente les chances du traitement contre la résistance bactérienne et évite son évolution. La commodité qui distingue les bactériophages est que ces derniers peuvent diversifier leurs codes génétiques suivant leurs hôtes. Malgré que les bactéries développent des résistances à force d'être exposées, en parallèle et naturellement, les bactériophages, eux aussi adoptent de nouveaux mécanismes qui inhibent les nouvelles résistances des bactéries. Alors, dans ces cas, cette qualité fait des bactériophages l'alternative de choix aux antibiotiques.

2.2.1 Caractéristiques et structure

Malgré la diversité de formes existantes dans le monde des bactériophages [75], ces virus possèdent au minimum un matériel génétique, ou encore la charge virale. Cette charge contient le génome du phage qui est codé soit sur de l'ADN ou de l'ARN et qui peut être présent sous forme double ou simple [76]. La nature de la charge virale est un élément judicieux pour le classement des bactériophages. En général, le matériel génétique est contenu dans une capside protéique, elle permet au bactériophage de protéger son code génétique contre le milieu, de détecter les organismes hôtes potentiels et de faciliter l'entrée de la charge virale dans l'hôte par le biais de l'appendice caudal (contractile ou non) [76, 77].

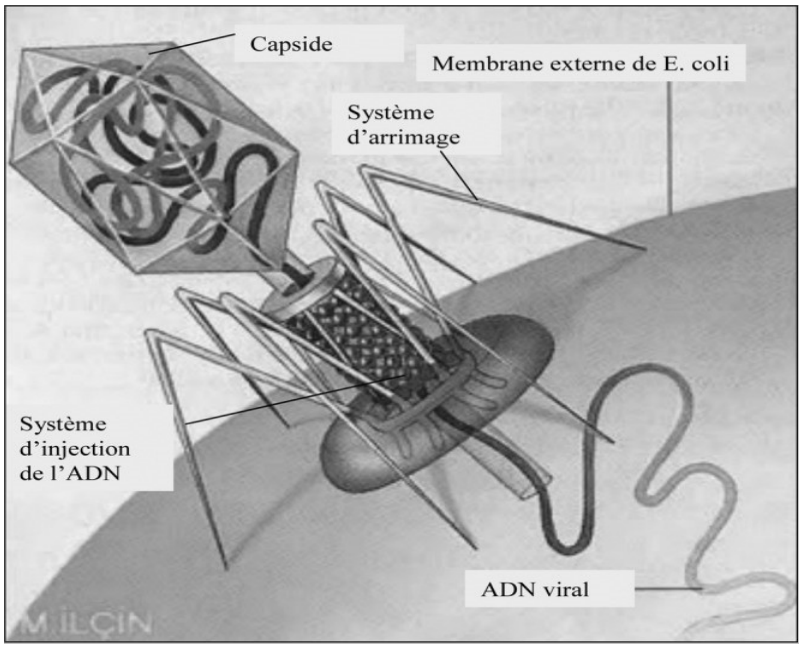

Figure 2.1 Structure du bactériophage T4, spécifique de la bactérie *Escherichia coli* [76]

2.2.2 Les familles de bactériophages

En plus de la capsule et la charge virale, des éléments supplémentaires sont considérés dans la structure des phages. On parle ici de la queue et de l'enveloppe ou les spicules. Comme mentionné précédemment, le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) a groupé les phages selon leur génome et leur morphologie. Pour plus de 179 genres d'hôtes bactériennes, des groupes de phages sont établis et subdivisés en dix familles rassemblées en un seul ordre, *Caudovirale*. La majeur partie des phages, équivaut à 95% des décrits, se condense dans les trois familles : *Myoviridae, Siphoviridae* et *Podoviridae*. La proportion restante se répartit dans les sept autres familles isolées. La phagothérapie est une propriété majoritaire de deux familles seulement (*Myoviridae* et *Siphoviridae*) [77, 78].

Tableau 2.1 Classification des bactériophages d'après Ackermann [78]

	Famille	Acide Nucléique	Nombre
Caudoviridale	*Myoviridae*	ADN double brin	1312
	Siphoviridae		3262
	Podoviridae		771
	Corticiviridae	ADN double brin	32
	Tectiviridae	ADN double brin	19
	Plasmaviridae	ADN double brin	5
	Inoviridae	ADN simple brin	66
	Microviridae	ADN simple brin	38
	Cystoviridae	ARN double brin	3
	Leviviridae	ARN simple brin	38

2.2.3 Les cycles phagiques

Le cycle lytique et le cycle lysogénique, ce sont les deux types de cycle viraux qui existent.

Commençant par le cycle lysogénique, c'est le cycle phagique des bactériophages tempérés. Ces phages ont la particularité d'incorporer leur génome au chromosome bactérien et lui transmettre par la suite, de nouvelles caractéristiques propices ou non. Appelés « agents dormants » à cause

qu'ils tapissent le génome bactérien durant de très longues périodes de temps avant de se répliquer et d'entamer le cycle lytique.

Les bactériophages lytiques, quant à eux, leur principal rôle est leur multiplication qui cause la destruction de la bactérie. C'est leur reproduction qui cause la lyse bactérienne, car ils utilisent sa machinerie pour leur propre intérêt et produire plusieurs dizaines de nouveaux phages (semblables à l'original). Les nouveaux phages restent sur les lieux afin d'affecter d'autres bactéries de la même espèce. On appelle donc ce processus le cycle lytique qui généralement ne dépasse les 30 minutes passant par plusieurs phases [76] :

- Le phage contient des récepteurs spécifiques à sa bactérie hôte avec lesquels il se fixe sur sa bactérie cible, c'est la phase de l'arrimage.
- Après la fixation, le phage perfore la paroi et la membrane de la bactérie.
- Assurer l'injection de la charge virale dans le cytoplasme bactérien.
- l'ADN ou l'ARN viral est utilisé pour reconstituer les éléments fondamentaux des futurs phages.
- Maturation et regroupement des divers éléments produits.
- La lyse bactérienne est la dernière phase, 50 à 100 clones du phage original sont le résultat du cycle lytique accompagné par la mort bactérienne.

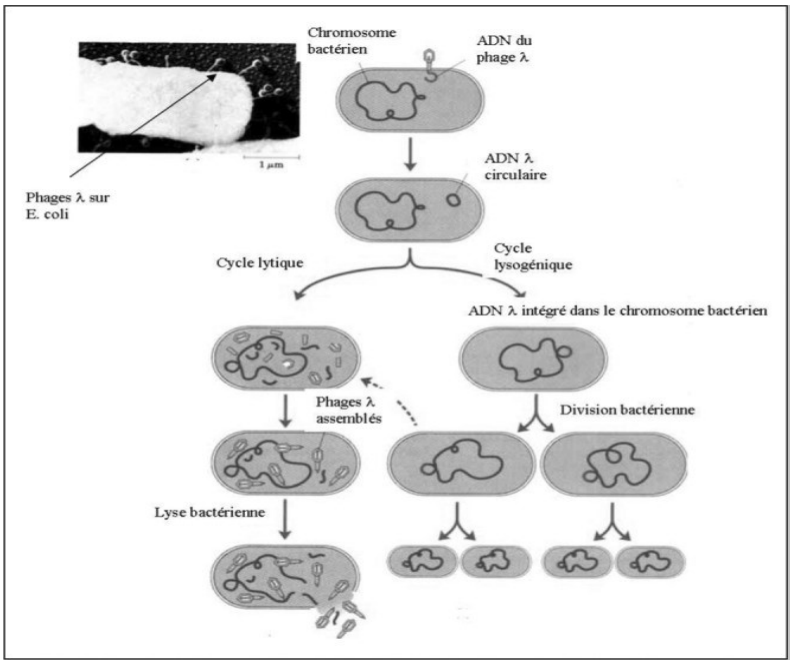

Figure 2.2 Les deux types de cycles (lytique et lysogénique) des bactériophages (lytiques, tempérés) [76]

Le cycle lytique est donc considéré comme une amplification de bactériophages, du moment que pour une bactérie attaquée il en résulte 50-100 nouveaux phages. Donc plus on a de bactéries plus la production de phages est élevée [76]. Seulement, en l'absence de bactéries, le cycle lytique n'aura pas lieu et par conséquent les bactériophages sont éliminés [77].

2.2.4 Le cocktail SPK

C'est un cocktail constitué par trois groupes de bactériophages lytiques principalement des familles *Myoviridae* et *Podoviridae*, issus de trois hôtes bactériennes différentes qui sont : *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* d'où son nom **SPK cocktail**. Ce cocktail est conçu et amplifié au niveau des laboratoires de Phagelux.Inc, une compagnie qui utilise des phages, des lysines et d'autres produits biologiques et des technologies d'administration

apparentées pour créer des produits et des solutions antibactériennes. Phagelux a son siège à Shanghai et compte au total quatre laboratoires de recherche dans le monde, ainsi que des sites de production situés aux États-Unis et en Chine. Phagelux possède à la fois des divisions HumanHealth et AgriHealth (phytotechnie, santé animale et sécurité alimentaire). La division HumanHealth a 5 produits en développement. La division AgriHealth a 6 produits sur le marché et 10 autres sont en cours de développement.

2.3 Processus de lyophilisation

La stabilité des produits pharmaceutiques est primordiale, sachant que les substances biologiques, particulièrement les protéines, les vaccins, les peptides ou encore les virus, sont influencés par tant de facteurs défavorisant alors leur conservation. Dans ce cas, la lyophilisation est élue comme meilleur procédé pour maintenir l'activité biologique.

2.3.1 Théorie de la lyophilisation

En générale, le cycle de lyophilisation est réparti en trois principales phases: la solidification connue sous le nom de congélation, la sublimation ou ce qu'on appelle le séchage primaire et finalement, le séchage secondaire ou le piégeage.

Pendant la lyophilisation, l'eau passe donc par les changements d'état mentionnés dans le schéma suivant :

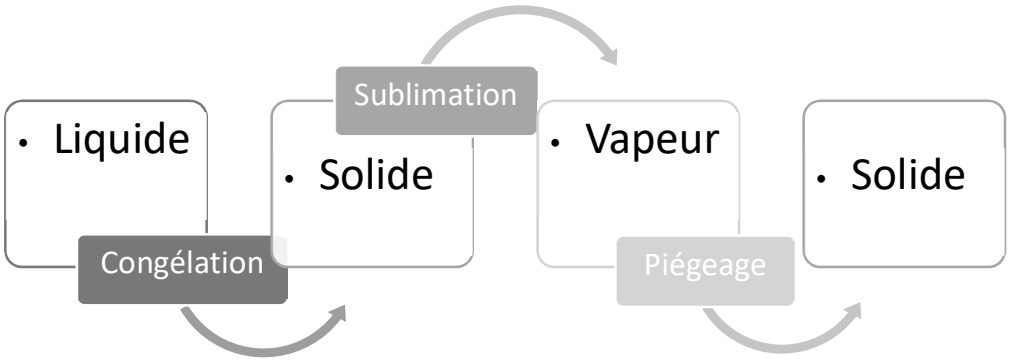

Figure 2.3 Schéma explicatif du processus de lyophilisation

La congélation est la transition du produit en solution de l'état liquide à l'état solide. Lorsqu'on abaisse la pression dans l'enceinte de l'appareil, l'eau solide passe à l'état gazeux et s'élimine progressivement du produit, c'est la sublimation (séchage primaire). Le séchage secondaire permet d'éliminer l'eau liée par adsorption à la surface des pores de la matière sèche ou incluse dans la masse du lyophilisat lors de la sublimation. Ces molécules d'eau éliminées du produit puis piégées sur une surface refroidie se transforment en glace, c'est le piégeage.

2.3.1.1 La congélation

La première étape de la lyophilisation est la congélation. Au cours de cette phase, une séparation s'effectue entre l'eau pure qui forme des cristaux et la solution contenant les excipients et les phages [79]. Plus la congélation se poursuit, plus l'eau de la solution gèle. La cristallisation ne s'applique pas pour toutes les solutions, certaines forment plutôt des solides amorphes, ceci est dû à leur viscosité qui lorsqu'elle devient suffisamment élevée inhibe la croissance des cristaux de glace. La vitrification est un processus qui se produit à une température prédéfinie qu'on appelle la température de transition vitreuse de la solution (T_g') [80]. L'eau restante à l'état liquide après la congélation est appelée eau liée. En général, 2°C inférieurs à la température de transition vitreuse

(T_g') est la température finale de congélation désirée. Le maintien de cette température pour un minimum de 2h assure la solidification radicale de la solution [81].

2.3.1.2 Le séchage primaire

En cette étape, la sublimation de la glace du produit congelé est assurée. Par la suite, la pression dans la chambre du lyophilisateur (P_c) est réduite, située majoritairement entre 50 et 200 mTorr [81]. La transmission de chaleur de la tablette à l'échantillon s'effectue à travers le plateau et le flacon favorisant ainsi la sublimation de l'eau cristallisée et son élimination par le condenseur. Les espaces occupés par les cristaux de glace donnent naissance à des bouchons poreux à la fin de la sublimation [79].

2.3.1.3 Le séchage secondaire

L'élimination de l'eau absorbée du produit, qui n'a pas été sublimée au séchage primaire, est réalisée dans cette étape. Cette eau est donc retirée par désorption [82].

2.3.2 Le lyophilisateur

Le lyophilisateur est composé principalement de deux parties [81], appelées aussi des chambres. La première chambre est disposée des étagères à températures contrôlées, dans cette partie c'est le fluide caloporteur qui contrôle la température des étagères lors de la sublimation ou alors le fluide réfrigérant, dans le cas de la congélation. La séparation de la vapeur d'eau est maintenue dans la seconde partie du lyophilisateur à des basses températures entre –50°C et -80°C. Un tube de gros diamètre entre les deux chambres assure le passage de la vapeur d'eau, il est parfois équipé d'une vanne à fermeture rapide. La présence d'une pompe à vide ou plusieurs en série est nécessaire pour gérer le vide dans tout le système [83].

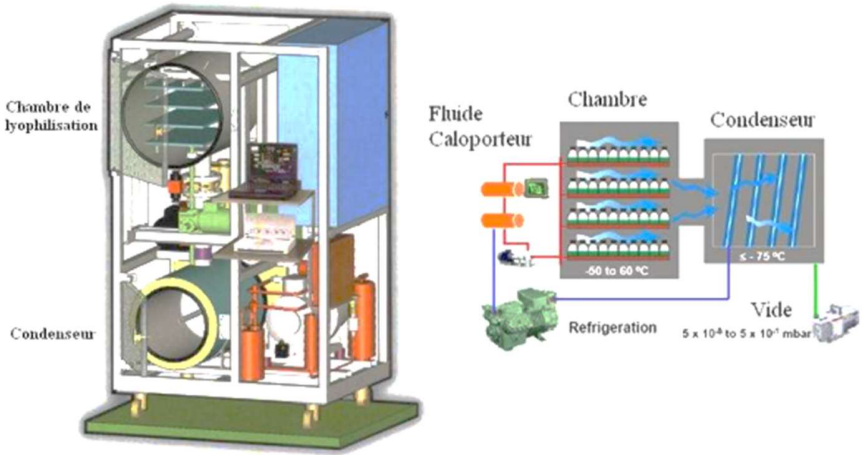

Figure 2.4 Lyophilisateur pilote SMH 45 USIFROID (lagep) [83]

2.3.3 Importance de la formulation en lyophilisation

Lors de la lyophilisation des protéines, spécialement les bactériophages, il est important d'adapter la formulation en identifiant les bonnes conditions afin de maximiser la stabilité et maintenir l'activité biologique de nos phages. Plusieurs composants de la formulation doivent être pris en considération, telle que la concentration des additifs qui peut avoir un impact sur l'activité des phages, la température de la transition vitreuse de la solution (Tg '), le pH…etc. Pour cette raison, un choix judicieux et sélectif de tous les constituants de la formulation des bactériophages doit être mis en avant afin d'entamer la lyophilisation [84].

De plus, l'efficacité du processus de la lyophilisation et la stabilité des bactériophages sont influencées aussi par le type de flacons utilisés. Cependant, des flacons en verre usinés par extrusion sont meilleurs pour un bon transfert de chaleur en comparaison avec les flacons de verre moulé [85, 86]. La rupture des flacons peut se provoquer s'ils sont remplis à plus de 30% de leur capacité. Ce phénomène peut être causé par l'expansion que peut prendre la formulation pendant la dessiccation [79]. Les bouchons ont un effet sur la stabilité à long terme du produit lyophilisé

grâce à leur humidité et leur taux d'adsorption et de désorption de cette dernière. Donc ils limitent l'humidification des lyophilisats lors du stockage et selon la littérature, les bouchons avec un faible taux d'humidité résiduelle et un faible taux d'adsorption, s'avèrent le bon choix [85].

2.3.3.1 Lyoprotectants et Cryoprotecteurts

Les étapes de la lyophilisation, comme indiqué antérieurement, provoquent des stress physiques et chimiques ce qui engendre généralement une perte d'activité des phages et/ ou une agrégation irréversible suite à ce processus. Cependant, l'ajout d'excipients stabilisants, soit des cryoprotectants ou lyoprotectants, aide à protéger la formulation et évite les effets indésirables de la lyophilisation [79, 87].

Les lyoprotectants sont des excipients utilisés principalement pour protéger les formulations des stress de séchage. De plus, ils possèdent généralement des propriétés cryoprotectantes pour protéger contre la congélation, ce qui fait d'eux une classe d'excipients favorisée. Lors de la lyophilisation, ces excipients préservent les structures natives des bactériophages en agissant comme substituts à l'eau [79].

La plupart du temps les lyoprotectants et/ ou cryoprotectants représentent un pourcentage important des solutés dans les formulations. Selon la littérature, les additifs les plus communément connus comme d'excellents stabilisants pour la lyophilisation des structures biologiques sont les sucres: le saccharose, le tréhalose, le glucose et le mannitol. La température de vitrification de ces sucres est appelée Tg', à cette température les lyoprotectants et/ ou cryoprotectants cristallisent et forment une matrice vitreuse ce qui immobilise les phages et empêche leur agrégation. C'est donc un processus qui limite la formation de liaisons hydrogène et protège les bactériophages contre les contraintes mécaniques des cristaux de glace. Bien que cette propriété thermique doit être

considérée lors de l'optimisation du cycle de lyophilisation. En règle générale, la phase de congélation doit être opérée en dessous de Tg ' de l'excipient [79].

2.3.3.2 Agents de masse et tonifiants

Généralement, pour ajuster la tonicité de la formulation, on lui ajoute les agents de masses. Ces additifs aident à augmenter le volume ou la masse du lyophilisat, ils préviennent aussi son affaissement ce qui améliore l'apparence du produit ainsi que son temps de réhydratation. Bien que du point de vue pharmaceutique, l'affaissement du produit lyophilisé n'est pas acceptable, mais il a aussi un effet négatif sur la formulation incluant la stabilité et le temps de réhydratation. Cet effet varie selon les composants étudiés, le mannitol et la glycine ont été cités par Meyer et al., 2009 comme agents de masses [50, 79, 88].

Dans le monde de la lyophilisation des substances biologiques, différents produits ont été utilisés comme lyoprotectants, cryoprotectants ou agents de masses, par exemple les acides aminés (Histidine, Leucine, Arginine, Alanine, Glycine, etc.), les disaccharides (Tréhalose, Saccharose, Maltose, Lactose, etc.), les polymères (Pullulant, Polyvinylpyrrolidone (PVP), Dextran, Polyéthylène glycol (PEG), hydroxypropylméthylcellulose (HPMC), etc.) ou les polyols (Mannitol, Sorbitol, Glycérol, etc.) [50, 79].

Pour la protection des bactériophages contre les phases de séchages lors du processus de lyophilisation, l'information sur les additifs ajoutés été limitée. Le lait écrémé est le lyoproteceur le plus cité dans la littérature [47, 48]. Comme les phages sont constitués principalement de capside protéique, des stratégies de formulations similaires à celle appliquées pour les protéines thérapeutiques, ont été testés sur les bactériophages [49]. Typiquement, les sucres et les polymères, comme le saccharose, le tréhalose, le mannitol et le PEG, sont le plus couramment utilisés pour la

stabilisation des protéines [26, 42, 89]. Récemment, l'utilisation du tréhalose avec du pullulant pour la stabilisation d'une protéine lyophilisé a révélé une perte d'activité de seulement 5% après 4 semaines de stockage [90]. Dans d'autres études, un phage de la famille *Siphoviridae* a été lyophilisé en ajoutant de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) avec et sans le mannitol [42]. Une autre étude s'est intéressée à l'effet de différents excipients sur la stabilité des bactériophages lyophilisés. Leur résultat a démontré que le tréhalose à une concentration de 0.5M était la meilleure formulation [26]. Pour la stabilité à long terme, une étude a été réalisée sur 25 phages lyophilisés et conservés à -20°C pour une période de 12 à 18 ans. Le résultat a révélé que le titre de seulement 8 phages a chuté, tandis que le reste a maintenu sa stabilité [39]. Toutes ces études s'intéressent principalement au stockage et les conditions de réfrigération à long terme. Par contre, les applications des bactériophages en tant que produit pharmaceutique se retrouvent avec un potentiel restreint. De plus, la différence entre les phages (famille et hôte) crée un challenge qui oblige à étudier chaque phage ou cocktail de phages d'une manière spécifique. Alors, il est très important de connaître ses bactériophages pour leur personnaliser le processus et la formulation de lyophilisation, comme suggéré par Ackermann [40].

En se basant sur la littérature et des formulations préparées par essais/ erreur, plusieurs stabilisants ont été utilisés à différentes concentrations. Notamment : le mélange pullulant/ tréhalose, le saccharose, le mannitol, le PEG et le HPMC pour les meilleures formulations. D'autres excipients ont fait partie de l'étude avec des résultats plus ou moins bons ou même une perte d'activité partielle à complète.

2.3.4 Qualité finale du lyophilisat

Au mépris des significatives progressions dans le domaine de la lyophilisation, encore des ambiguïtés persistent en ce qui concerne la définition claire de la qualité attribuée à un produit

pharmaceutique lyophilisé. Outre la considération essentielle de la conformation des bactériophages et de leur stabilité, il existe des considérations pratiques sur l'apparence du «gâteau» lyophilisé, sa stabilité physique et sa dissolution rapide et complète lors de la reconstitution [41]. En règle générale, toute substance biologique lyophilisée devrait avoir certaines caractéristiques souhaitables, notamment : la stabilité à long terme, la préservation des caractéristiques chimiques et physiques primaires du produit, l'aspect visuel du lyophilisat et le temps de réhydratation court [79]. Quoi que, les bactériophages lyophilisés seront appliqués dans le développement des patchs transdermiques contrôlés par un système de relargage. Toutefois, la caractéristique de l'aspect visuel est plus ou moins négligée dans cette étude.

2.4 Les patchs transdermiques (système de relargage)

Plusieurs essais cliniques ont été effectués dernièrement concernant la phagothérapie ou encore le traitement par bactériophages. Une étude clinique, récemment menée par Rose *et al*. a démontré l'efficacité d'un cocktail de phages dans le traitement des infections causées par *P.aeruginosa* et *S.aureus* dans des plaies de brûlures [91]. Généralement, la délivrance des bactériophages est sous forme liquide simple dans l'utilisation clinique des phages. Quoique son efficacité thérapeutique peut être affectée par des facteurs environnementaux indésirables qui induisent une chute rapide du titre phagique tels que la température, le pH ou encore la réponse du système immunitaire. C'est alors qu'un système d'administration approprié est nécessaire pour des applications humaines; spécifiquement le traitement des infections des plaies de brûlures. De plus et récemment, presque 74% des médicaments administrés par voie orale sont jugés insatisfaisant du point de vue efficacité. Dans le but d'améliorer ce caractère, un système de délivrance de médicaments transdermiques (TDDS), également connu sous le nom de patchs, a été mis au point et approuvé par la FDA [92, 93].

Pour cet avantage, des patchs à base de phages ont été réalisés dans cette étude afin de minimiser l'inefficacité du traitement. La délivrance des bactériophages se définit par un relargage à partir d'un système polymérique biodégradable. Néanmoins, ces patchs comprennent des polymères qui permettent la libération prolongée de phages, permettant ainsi à la fois le traitement et la prévention des infections. L'application du patch s'effectue sur la plaie une fois et pourra être réappliqué après sa dégradation partielle variant entre 3 et 7 jours.

2.4.1 Poly Ester Amide Urée (PEAU)

Le polymère biodégradable de revendication, utilisé pour la préparation de patches, étant un poly (ester amide urée) comprenant les deux blocs démontrés sur la **figure 2.5** à répartition aléatoire de ceux-ci. C'est un polymère dans lequel au moins un diol, un diacide et un acide aminé sont liés ensembles par une liaison ester, une liaison amide et une liaison urée.

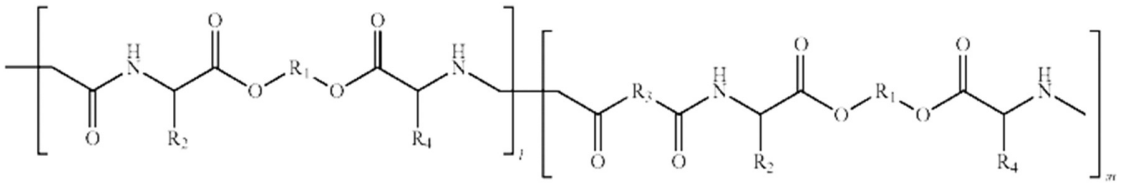

Figure 2.5 les deux blocs compris dans le polymère PEAU à une répartition aléatoire [94].

Le poly (ester amide urée) est utilisé comme un système stabilisant pour les bactériophages lyophilisés, il est connu pour sa stabilisation des matériaux biologiques. En plus de la stabilisation supplémentaire apportée aux bactériophages, ce polymère agit comme une matrice biodégradable qui permet en même temps un relargage contrôlé des phages inclus dans cette matrice [94].

CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODOLOGIE

3.1 Matériels

Saccharose (#SLBS1252V), Tréhalose (# SLBZ3792), HydroxyPropyl Methyl Cellulose (HPMC) (#MKBV9071V), Phosphate de Sodium (#30K0228), le Mannitol (#SLBP5012V), le Maltose (#SLBN0860V), Glucose (#MKBX8849V), l'Agar (#BCBZ3755) ont été achetés auprès de Sigma. Le Lactose (#L6-500) et Methylene chloride (Dichloromethane) (DCM) (#STBG4998V) achetés auprès de Fisher. Le Pullulant (#7H08) donné généreusement par NutriScience. Le Polyéthylène glycol 6000 (PEG6000) (#10196945) Alfa Aesar. EMEM (#81119555) acheté auprès d'ATCC, sérum de cheval acheté auprès de Cedar Lane. Le Tryptic Soy Broth (TSB) (#VM803925 735) a été acheté auprès de Millipore.

Les bactéries (KP, PSA, SaA) ont été obtenues auprès de l'Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) et ATCC. Les bactériophages (SPK cocktail) ont été généreusement offerts par Phagelux.

Poly Ester Amide Urée (PEAU) et Tris HCl-$MgSO_4$-NaCl (TMN) ont été préparés par les laboratoires de Phagelux.

Lyophilisateur Bancoco (#7948020/ #7934024), viols de 10 ml en verre, bouchons en caoutchouc, pochettes médicales pour patchs (emballage 3M), tubes de dilution de 1.5 ml, hôte biologique, hôte chimique, plaques de pétries, pipettes et l'incubateur ont été fournis par les laboratoires de Phagelux.

3.2 Méthodologie

3.2.1 Préparation des milieux de cultures

3.2.1.1 Le Tryptic Soy Broth (TSB)

Pour une quantité de 500 ml de TSB, 15 g de TSB poudre a été diluée dans 500 ml d'eau stérile. La solution finale a été autoclavée pour avoir un produit stérile.

3.2.1.2 Gélose (Top Agar)

Pour une quantité de 100 ml de Top Agar, 3 g de TSB poudre a été diluée dans 100 ml d'eau stérile puis ajoutée à 0.7 g d'Agar. La solution finale a été autoclavée pour avoir un produit stérile.

3.2.1.3 Le Tryptic Soy Broth Agar (TSA)

Pour une quantité de 800 ml de TSA, 24 g de TSB poudre a été diluée dans 800 ml d'eau stérile puis ajoutée à 12 g d'Agar. La solution finale a été autoclavée pour avoir un produit stérile.

3.2.2 Titration

Afin de tester l'activité et/ ou la stabilité des bactériophages, une série de titration a été effectuée.

Pour ce faire, 100 µL de culture bactérienne en phase logarithmique a été ajoutées à 2.5 ml de Top Agar (gardé à 60°C) ont été coulés dans des géloses de TSA. En parallèle, un volume de 11.1 µL de phages a été ajouté à 100 µL de TSB dans des tubes de dilution pour le diluer. Des dilutions de 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-} et 10^{-8} ont été préparées. Ensuite 11.1 µL de chaque dilution (10^{-1} jusqu'à 10^{-8}) de plus de la suspension des phages sans dilution et un contrôle négatif (TSB) ont été déposés sur les géloses de TSA préparées précédemment. Ces géloses ont été incubées à 37°C durant toute la nuit. Un schéma explicatif de la manœuvre est affiché sur la figure suivante (Figure 3.1).

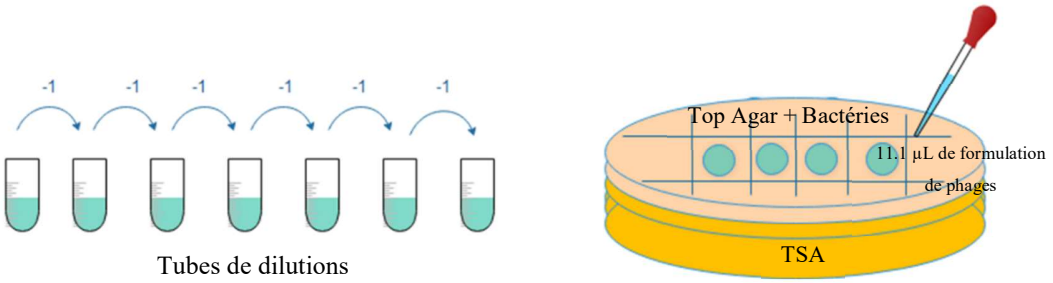

Figure 3.1 Schéma explicatif de la méthode de Titration

Le lendemain de la titration et après incubation à 37°C, la lecture des résultats a été effectuée de la façon suivante :

Le nombre de plages de lyses dans une goutte de 11.1 µL x le facteur de dilution x 100 = le nombre de phages par ml (pfu/ml)

3.2.3 Préparation des formulations et cycles de lyophilisation

Le développement du procédé de lyophilisation s'est déroulé selon une approche expérimentale empirique consistant à « essais et erreurs ». Cette étude décrit l'utilisation de la théorie phénoménologique, avec des paramètres clés déterminés par la littérature afin d'optimiser les formulations et les cycles de lyophilisation pour le SPK cocktail.

Pour une préparation de 20 fioles, 18 ml de formulation d'excipients pour 2 ml de bactériophages volume/ volume a été mélangée puis répartie par 1 ml dans des fioles en verre de capacité de 10 ml. Plusieurs formulations ont été préparées en utilisant différents excipients avec différentes concentrations pour lyophiliser le SPK cocktail de phages.

Tableau 3.1 Tableau représentatif des formulations

Le lot de la formulation #	Les excipients avec leurs concentrations	Cycle de lyophilisation
3	100% TMN	P2
7	0.1 M Saccharose	P2
6	0.5 M Saccharose	P1
10	0.5 M Tréhalose	P1
12	0.1 M Tréhalose	P1
84	11.1% pullulant+ 0.56 M Tréhalose	P4
90	1 mg/ml Glucose	P4
91	0.05 mg/ml Glucose	P4
96	1 mg/ml Maltose	P4
97	0.05 mg/ml Maltose	P4
53	11.1% Pullulant+ 0.56 M Tréhalose	P3
31	0.5% HPMC	P3
40	5% PEG6000 + 0.1M Saccharose	P3
41	2% PEG6000 + 0.1M Saccharose	P3
29	0.1 M Mannitol	P3
30	0.5 M Mannitol	P3
37	0.5 M Saccharose	P3
102	0.1 M Saccharose	P3

Un test de stabilité a été effectué sur les échantillons en triplicata pour chaque formulation. Les points de mesures étaient : avant et directement après lyophilisation, à 1 mois, 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois.

3.2.4 Les cycles de lyophilisation

Le protocole de lyophilisation a été réalisé selon une méthode précédemment conçue pour les bactériophages et/ ou les protéines. Les cycles de lyophilisation ont été conçus pour être aussi conservateurs que possible afin de prendre en charge le large éventail de formulations utilisées dans cette étude particulière et ont été conduits comme suit (tableau 3.2).

Pour le cycle P1 : Les échantillons ont été déposés sur les étagères refroidies à -30°C pendant 30h, une demi-heure après le dépôt des échantillons, le vide a été allumé. Avec une rampe de 0.1°C/min, la température a été élevée à 25°C et maintenue pendant 10h. Pour finir le cycle, la température a été réduite à 4°C avec une rampe de 1°C, les échantillons sont restés à cette température au lyophilisateur jusqu'à ce que l'arrêt manuel se fasse et le retrait des échantillons après les avoir fermé sous vide.

Pour le cycle P2 : est identique au P1, la différence c'est que les échantillons ont été congelés à -80°C dans de la glace sèche pendant 1min puis mis au lyophilisateur pour suivre le processus du cycle P1.

Le cycle P3 : les étagères ont été mises à une température 5°C, contrôlée manuellement. Après avoir déposé les échantillons, le mode automatique personnalisé a été lancé. La température est passée de 5°C à -5°C avec une rampe de 1°C/min pendant 30min de temps. Avec la même rampe, la température descend à -30°C; 30min après, le vide a été allumé pendant 33h. Ensuite, avec une rampe de 1°C/min, la température a été augmentée jusqu'à 25°C pour 10h. Enfin, une température de 4°C a été maintenue jusqu'à ce que les échantillons ont été fermés sous vide et retirés, avec une rampe de 1°C/min.

Le cycle P4 commence avec une rampe de 0.67°C/min pendant 1.3h pour atteindre la température de -40°C. En ce moment les échantillons ont été déposés au lyophilisateur pendant 3h sous cette température. Le vide a été allumé dès que les échantillons se sont congelés. Par la suite, la température a été augmentée à 0°C avec une rampe de 1°C/min et maintenue pendant 18h. Puis à 25°C pendant 6h à une rampe de 0.07°C/min. Finalement, à 4°C avec 1°C/min de rampe et cela jusqu'à la récupération des échantillons, fermés sous vide avant le retrait.

Une pression de chambre de 100 mTorr a été appliquée pour tous les cycles. Après lyophilisation, les flacons ont été stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 3.2 Tableaux résumant les cycles de lyophilisation P1, P2, P3 et P4

Le cycle P1

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Temps (h)	Commentaire
-30	-	30	Mettre les échantillons, allumer le vide quand c'est gelé
25	0,1	10	
4	1	Indéfini	Fermer sous vide puis sortir les échantillons

Le cycle P2

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Temps (h)	Commentaire
-80	-	0,016	Dans la glace sèche
-30	-	30	Mettre les échantillons, allumer le vide quand c'est gelé
25	0,1	10	
4	1	Indéfini	Fermer sous vide puis sortir les échantillons

Le cycle P3

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Temps (h)	Commentaire
5	-	0.5	Mettre les échantillons
-5	1	0.5	
-30	1	33,3	Allumer le vide après 30 min
25	0,1	10	
4	1	Indéfini	Fermer sous vide puis sortir les échantillons

Le cycle P4

Température (°C)	Rampe (°C/min)	Temps (h)	Commentaire
-40	0,67	1,3	Mettre les échantillons
-40	0	3	Allumer le vide
0	1	18	
25	0,07	6	
4	1	Indéfini	Fermer sous vide puis sortir les échantillons

3.2.5 Les patches à base de bactériophages lyophilisés

La production des patchs composés de polymères biodégradables et des bactériophages projette un effet de peau artificielle. Ce sont des pansements biodégradables pour le traitement des infections bactériennes des plaies de brûlures.

3.2.5.1 Préparation des patchs

Pour ces patchs, 4mL de solution de polymère contenant 13 % PEAU poids/ volume dans du DCM a été ajouté au mélange de deux violes de bactériophages lyophilisés et 0.06 g de TMN en poudre. Ensuite, le tout a été homogénéisé pendant 20 s puis versé dans des plaques en Téflon sur une surface plate. Les plaques ont été couvertes et séchées à une température pièce pendant une nuit pour que le DCM s'évapore.

Une fois la formulation sèche, elle a été découpée en petits morceaux égaux. Chaque morceau a été celé à vide séparément dans les emballages 3M afin de les protéger des UV auxquels les bactériophages sont sensibles [95]. Puis ils ont été stockés à deux températures 4°C et 26°C.

Différentes formulations de bactériophages lyophilisés ont été utilisées pour préparer une douzaine de patchs différents. Seulement sept formulations ont été suivies pour une stabilité sur 6 mois.

Tableau 3.3 Tableau représentatif des formulations de chaque patch

Le lot du patch #	La formulation utilisée lors de la lyophilisation du SPK cocktail
HB001	11.1% Pullulant + 0.56 M Tréhalose
HB002	0.1 M Saccharose
HB003	12 mg/ml Lactose + 5 mg/ml PEG6000
HB004	0.5 M Mannitol
HB006	0.1 M Saccharose + 5% PEG6000
HB009	0.1 M Saccharose + 0.5% HPMC + 24 mM Phosphate de sodium
HB010	0.1 M Saccharose + 0.5% HPMC

3.2.5.2 Test de relargage

Un mélange de 45 ml d'EMEM + 5 ml de sérum de cheval a été préparé pour le test de relargage. Dans des petits tubes, 1 ml de cette solution a été aliquotée. Pour chaque patch, un relargage a été effectué pour les périodes suivantes : 0 min, 1h, 2h, 5h, 24h, 48h, 72h et une semaine. Le patch se faisait trempé pour chaque période de temps dans un tube contenant la solution (EMEM + sérum de cheval) puis incubé à 37°C pendant cette durée, puis transféré vers le tube du point suivant jusqu'à arriver à une semaine. Cette manœuvre a été répétée en triplicata pour chaque patch à deux températures de stockages différentes 4°C et 26°C. Un test de stabilité a été mis en place en utilisant la méthode de titration pour chaque point et cela pendant une durée de 6 mois de stockage passant par les points suivants : T_0, 1 mois et 3 mois.

3.2.6 Analyses statistiques

Pour déterminer la signification entre les ensembles de données, les moyennes des ensembles de données ont été calculées et une estimation groupée de l'erreur a été utilisée; Le calculer a été effectué à la fois par le test *t* de *Student* et par le test ANOVA avec un niveau de significativité de 5% ($p<0,05$). Une valeur de $p<0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

Le test *t* de *Student* compare les moyennes des données alors que l'ANOVA compare la variance des données.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Sélection des formulations

Les figures suivantes représentent l'activité des bactériophages avant et après lyophilisation des formulations et leur stabilité sur une année de stockage à 4°C, en utilisant différents cycles de lyophilisation. Le suivi de la stabilité de quelques formulations s'est arrêté à 6 mois ou à 9 mois, cela est dû en manque d'échantillons préparés en début du projet. Le dénombrement des plaques après les titrations a permis de calculer le titre du cocktail SPK qui aurait été présent dans chaque échantillon testé. Une perte de moins d'un log n'est pas considérée significative dû aux erreurs attribuées à la titration.

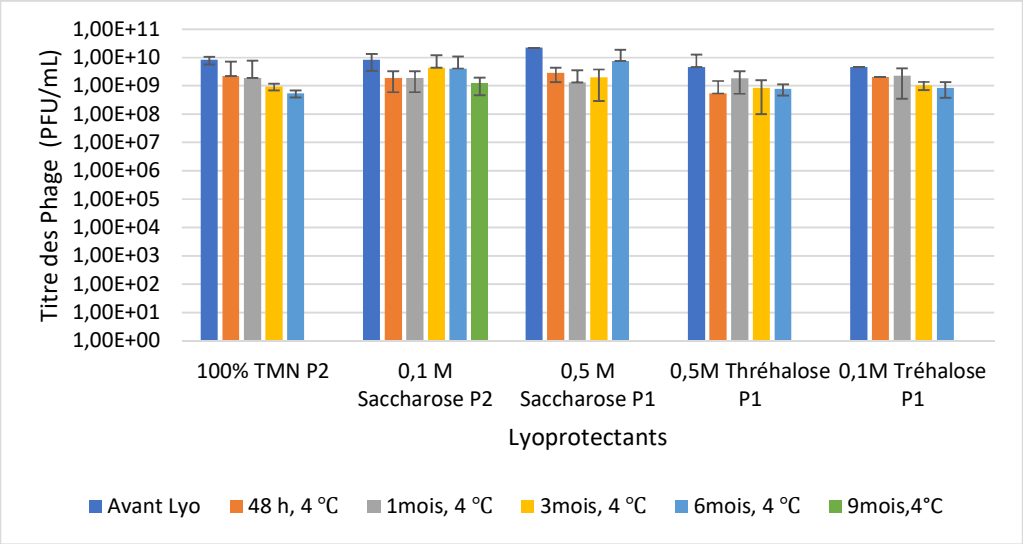

Figure 4.1 L'effet du TMN, Saccharose et du Tréhalose sur le cocktail SPK en utilisant les cycles de lyophilisation P2 et P1. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Un titre de 10^9 pfu/ml a été calculé pour les formulations de TMN, Tréhalose (les deux concentrations 0.1 M et 0.5 M) et le Saccharose à 0.1 M; et un titre de 10^{10} pour 0.5 M Saccharose

avant lyophilisation. Cependant, aucune perte d'activité lytique n'a été indiquée lors du mélange des formulations, sachant que le titre initial a été 10^{10} pfu/ml et 10^{11} pfu/ml respectivement et une dilution de 10 fois a été réalisée pour chaque formulation. En revanche, la lyophilisation des échantillons a conduit une perte de moins d'un log d'activité lytique, juste après ce processus. Ce résultat a été présenté au niveau de toutes les formulations, indépendamment du cycle de lyophilisation utilisé ou encore de la concentration de l'excipient utilisé. L'activité lytique du 100% TMN (P2) est restée stable jusqu'à 3 mois de stockage à 4°C, seulement 1 log de perte a été signalé au bout de 6 mois de stockage. Le Saccharose (P2) avec une concentration de 0.1M a gardé sa stabilité même après 9 mois de stockage à 4°C, la perte été faible voir négligeable. Avec une concentration de 0.5M (P1), un le seul log a été perdu directement après lyophilisation, aucune autre perte importante n'a été observée, vu que le titre est resté 10^9 jusqu'à 6 mois de stockage à 4°C. Le Tréhalose, pour les deux concentrations (0.1M et 0.5M), sa stabilité été presque la même, une perte inférieure à 1 log a été reportée sur les résultats après un stockage de 6 mois à une température de 4°C. (Figure 4.1).

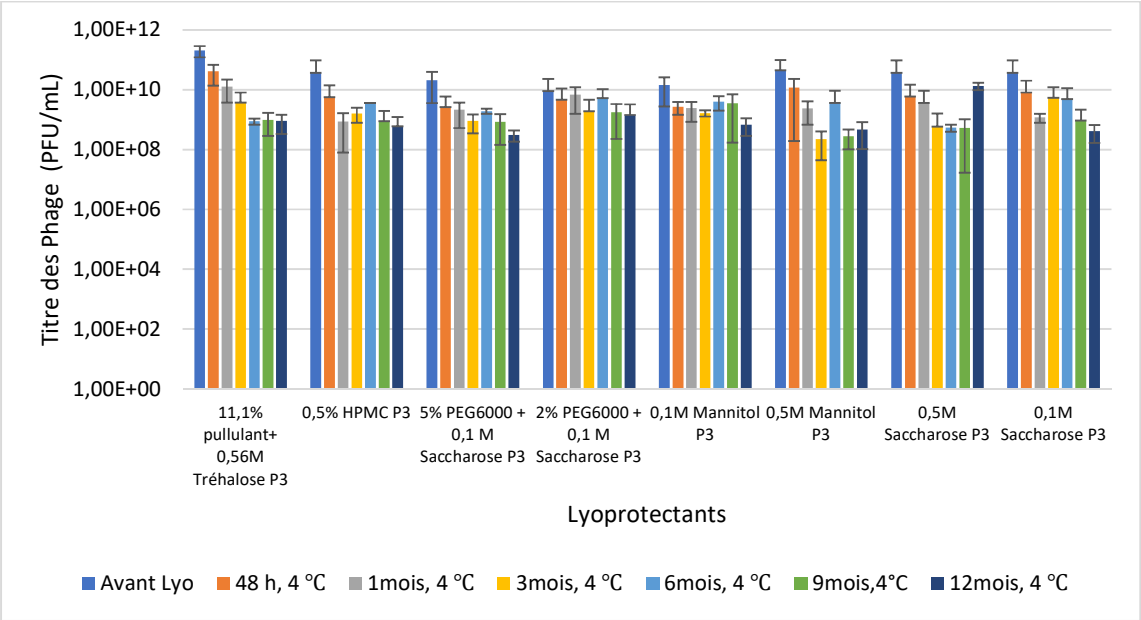

Figure 4.2 L'effet du Pullulant+ Tréhalose, HPMC, PEG6000, Mannitol et du Saccharose sur le cocktail SPK en utilisant le cycle de lyophilisation P3. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Le titre pour les formulations 0,5% HPMC, 5% PEG6000 + 0,1 M Saccharose, 2% PEG6000 + 0,1 M Saccharose, 0,1 et 0,5M Mannitol, 0,5 et 0,1 M Saccharose a été calculé pour 10^{10} pfu/ml, un titre de 10^{11} pfu/ml a été reporté pour la formulation de 11,1% pullulant+ 0,56 M Tréhalose, avant lyophilisation. Juste après lyophilisation, une perte de 1 log a été calculée pour toutes les formulations, sauf pour le Mannitol à la concentration de 0,5 M aucune perte n'a été signalée.

L'activité lytique du 11,1% pullulant+ 0,56 M Tréhalose, est restée stable jusqu'à un mois de stockage à 4°C, une perte de 1 log s'est présentée après 3 mois de stockage pour garder ce titre aux alentours de 10^9 pfu/ml et cela jusqu'à une année de stockage à la même température citée précédemment. Le 0,5% HPMC, 5% PEG6000 + 0,1 M Saccharose, 0,1 M Mannitol et 0,1 M Saccharose, jusqu'aux 9 mois de stockage à une température de 4°C, le titre été maintenu près de 10^9 pfu/ml, seulement après un an de stockage, une perte moins de 1 log a été calculée.

Aucune perte significative d'activité lytique n'a été signalée pour 2% PEG6000 + 0,1 M Saccharose durant toute une année de stockage à 4°C (P>0.05). Après 6 mois de stockage à une température de 4°C, le titre de 0,5 M Mannitol a été maintenu pas loin de 10^9 pfu/ml, dès 9 mois jusqu'à un an de stockage, une perte moins de 1 log a été calculée. À 3 mois, le titre été à 10^8 pfu/ml puis ça a remonté à 10^9 pfu/ml, cette chute au milieu été dû aux hôtes bactériennes utilisées pour ce test (densité optique et/ou le Master pllate). L'activité lytique est restée stable jusqu'à un moi de stockage à 4°C pour le 0,5 M Saccharose, une perte de 1 log s'est présentée après 3 mois de stockage pour garder ce titre aux alentours de 10^8 pfu/ml et cela jusqu'à 9 mois de stockage à la même température citée précédemment. Le test de stabilité effectué pour un an de stockage a émis une donnée aberrante, probablement causée soit par la densité optique des bactéries ou bien par la préparation du Master plate de ces mêmes bactéries. (Figure 4.2)

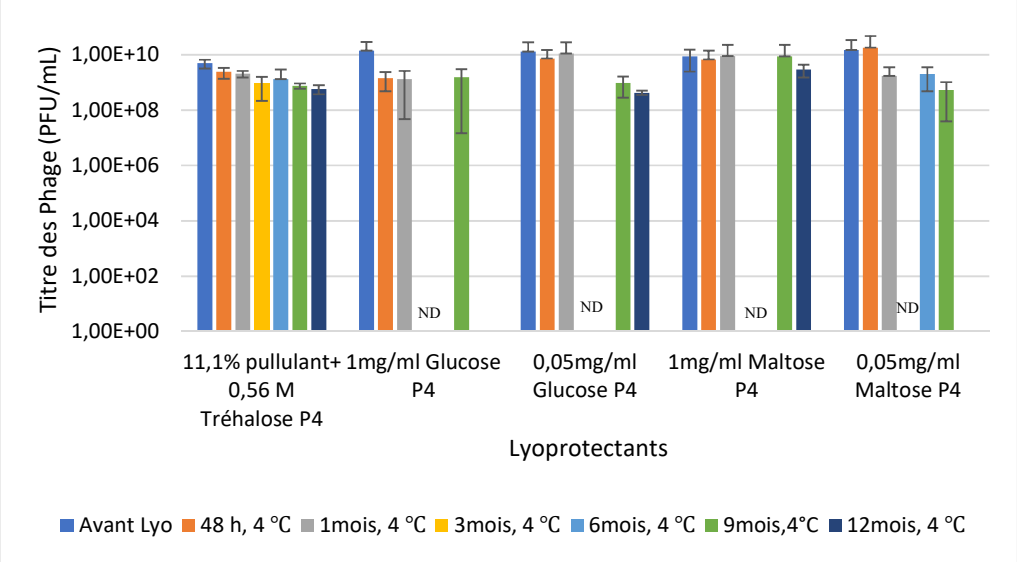

Figure 4.3 L'effet du Pullulant + Tréhalose, Glucose et du Maltose sur le cocktail SPK en utilisant le cycle de lyophilisation P4. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3). ND : valeurs non définies

Un titre de 10^9 pfu/ml a été calculé pour les formulations de 11,1% pullulant+ 0,56 M Tréhalose et le Maltose à 1mg/ml; tandis qu'un titre de 10^{10} pour 1mg/ml et 0,05mg/ml de Glucose et le Maltose à 0,05mg/ml avant lyophilisation. Cependant, aucune perte d'activité lytique significative n'a été indiquée après lyophilisation en utilisant les formulations suivantes : 11,1% pullulant+ 0,56 M Tréhalose et le Maltose avec ses deux concentrations ($P>0.05$). En revanche, la formulation du Glucose (1mg/ml et 0,05mg/ml) a conduit une perte de moins d'un log d'activité lytique, juste après ce processus. L'activité lytique du 11,1% pullulant+ 0,56 M Tréhalose est restée stable avec un titre de 10^9 pfu/ml après une période de stockage de 6 mois à 4°C. Une perte de moins d'un log a été calculée après 9 mois de stockage pour enfin garder ce titre même après une année.

Pour le 1mg/ml Glucose et 1mg/ml Maltose, aucune perte d'activité lytique n'a eu lieu durant et jusqu'à un an de stockage pour le Maltose et 9 mois pour le Glucose, à une température de 4°C. Le titrage n'a pas été prélevé pour 3 mois et 6 mois de stockage. L'activité lytique du 0,05mg/ml Glucose est restée stable jusqu'à 1 mois de stockage, par contre une perte de 1 log puis 2 log a été calculée pour les durées de stockage de 9 mois et un an respectivement. Le titrage n'a pas été prélevé pour 3 mois et 6 mois de stockage par manque de temps. Le 0,05mg/ml Maltose P4 a connu une perte de 1 log après 1 mois de stockage à 4°C, et est resté stable jusqu'à 6 mois pour en perdre un nouveau log à une durée de stockage de 9 mois à la même température de stockage. Le titrage n'a pas été prélevé pour 3 mois de stockage. (Figure 4.3).

4.2 Comparaison des cycles de lyophilisation

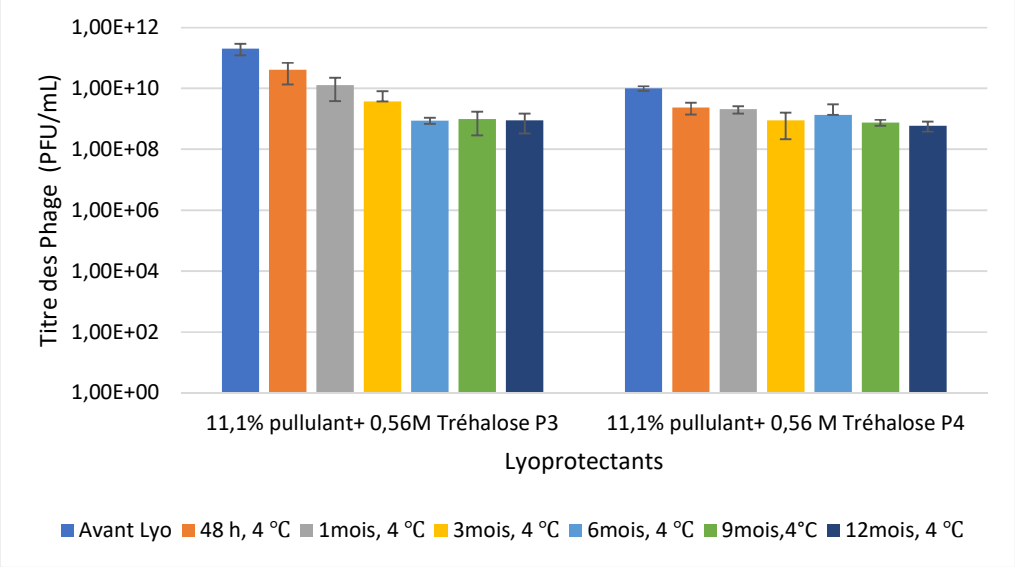

Figure 4.4 L'effet des cycles de lyophilisation P3 et P4 sur le cocktail SPK en utilisant la formulation 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La formulation lyophilisée en utilisant le cycle P4 été plus stable que celle effectuée avec le cycle P3. De plus, aucune perte d'activité lytique significative n'a été calculée durant toute la durée du stockage jusqu'à une année à une température de 4°C. Tandis qu'en utilisant le cycle de lyophilisation P3 avec la même formulation, une perte d'un log a été représentée directement après lyophilisation. Ce titre a été maintenu à 10^{10} pfu/ml jusqu'à 1 mois de stockage, pour ensuite diminuer aux alentours de 10^{9} pfu/ml pour la durée restante de l'étude qui été une année de stockage à 4°C. (Figure 4.4).

Tableau 4.1 Tableau récapitulatif des résultats des formulations et des cycles de lyophilisation

Le lot de la formulation #	Les excipients avec leurs concentrations	Cycle de lyophilisation	Durée de stabilité	perte d'activité
3	100% TMN	P2	6 mois	< 1 log
7	0.1 M Saccharose	P2	9 mois	< 1 log
6	0.5 M Saccharose	P1	6 mois	< 1 log
10	0.5 M Tréhalose	P1	6 mois	< 1 log
12	0.1 M Tréhalose	P1	6 mois	< 1 log
84	11.1% pullulant+ 0.56 M Tréhalose	P4	12 mois	< 1 log
90	1 mg/ml Glucose	P4	9 mois	~ 1 log
91	0.05 mg/ml Glucose	P4	12 mois	< 1 log
96	1 mg/ml Maltose	P4	12 mois	< 2 log
97	0.05 mg/ml Maltose	P4	9 mois	< 2 log
53	11.1% Pullulant+ 0.56 M Tréhalose	P3	12 mois	< 2 log
31	0.5% HPMC	P3	12 mois	< 2 log
40	5% PEG6000 + 0.1M Saccharose	P3	12 mois	< 2 log
41	2% PEG6000 + 0.1M Saccharose	P3	12 mois	< 1 log
29	0.1 M Mannitol	P3	12 mois	< 2 log
30	0.5 M Mannitol	P3	12 mois	< 2 log
37	0.5 M Saccharose	P3	12 mois	< 1 log
102	0.1 M Saccharose	P3	12 mois	< 2 log

4.3 Application des phages lyophilisés dans des patches

Le comportement de libération des bactériophages, lors de leur application dans des patchs biodégradables, a été étudié et illustré aux figures ci-dessous.

HB001 : 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose

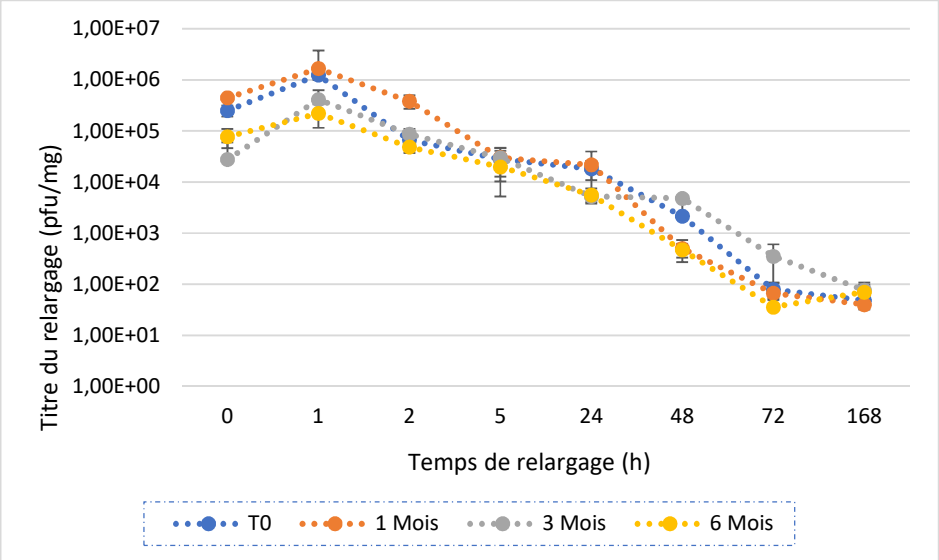

Figure 4.5 Le relargage du patch SPK avec 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

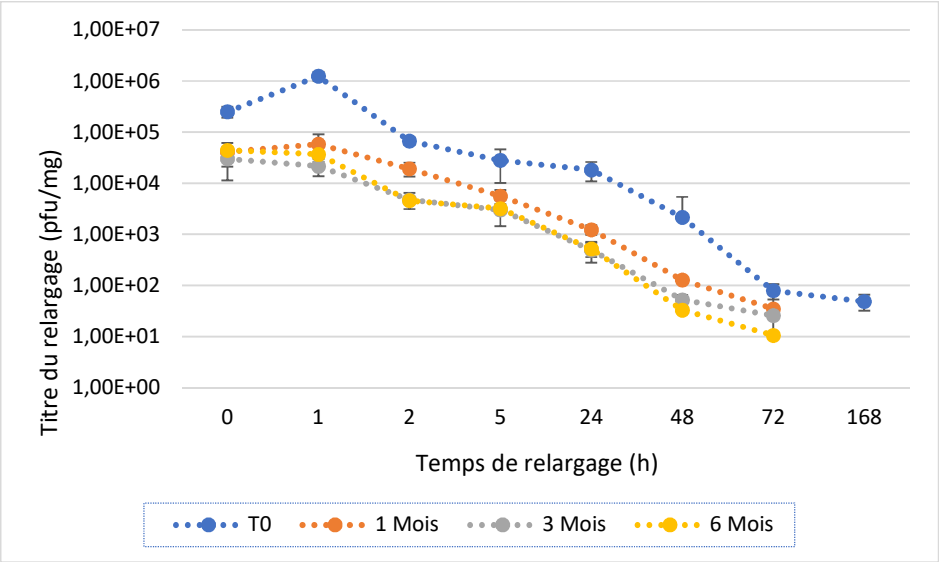

Figure 4.6 Le relargage du patch SPK avec 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.5** démontre le relargage des patchs à base du cocktail SPK de bactériophages lyophilisés avec la formulation 11,1% pullulant+ 0,56M Tréhalose et stockés à une température de 4°C. Les périodes T_0 et 1 mois ont démontré un relargage qui s'amplifie graduellement et atteint son maximum avec un titre de 10^6 pfu/ml, à 1h d'incubation à 37°C. Une chute de 1 log a été calculée après chaque temps de mesure jusqu'à arriver à 10^1 pfu/ml pour une semaine de relargage. À 3 mois et 6 mois le titre maximal été 10^5 pfu/ml, le relargage ici a suivi le même rythme qu'à T_0 et 1 mois. Tandis qu'à un stockage à 26°C des mêmes patchs cités précédemment (**figure 4.6**) le titre maximal atteint à 1 mois, 3 mois et 6 mois été de 10^4 pfu/ml à 1h de relargage pour descendre à 10^1 pfu/ml après 72h. Arrivée à une semaine, aucune activité lytique n'a pu être calculée.

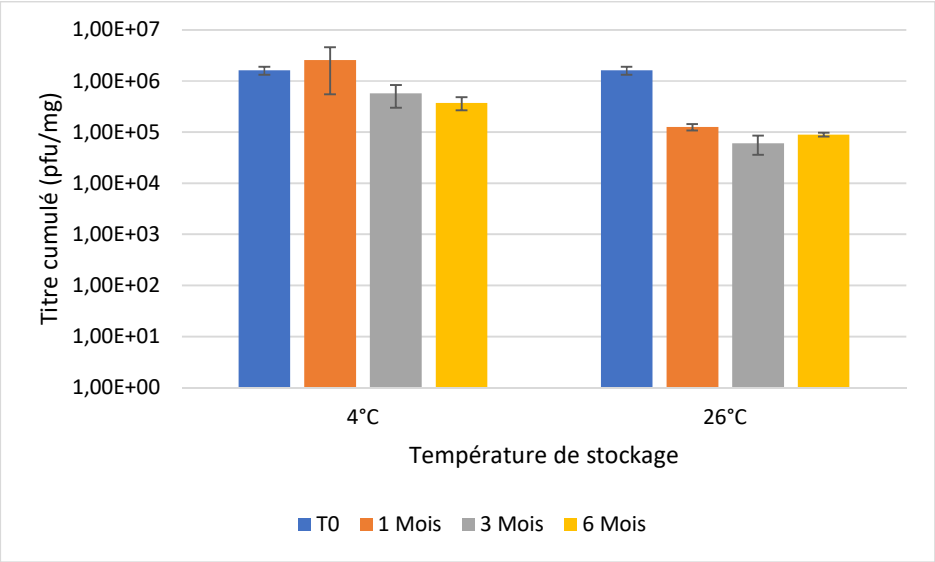

Figure 4.7 Relargage cumulé du patch SPK avec 11,1% pullulant + 0,56M tréhalose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.7** démontre la comparaison du relargage cumulé des patchs biodégradables à base de bactériophages, entre deux températures de stockage : 4°C et 26°C. Suivis jusqu'à 6 mois. À T_0 le titre été similaire pour les deux échantillons 10^6 pfu/ml. Après 1 mois de stockage, une perte de 1 log a été calculée à 26°C contrairement à 4°C où aucune perte n'a été signalée. Dès 3 mois, une diminution de 1log a été signalée pour les deux températures de stockage. Ce titre a été préservé jusqu'à 6 mois :10^5 pfu/ml et 10^4 pfu/ml pour 4°C et 26°C respectivement.

HB002 : 0,1M saccharose

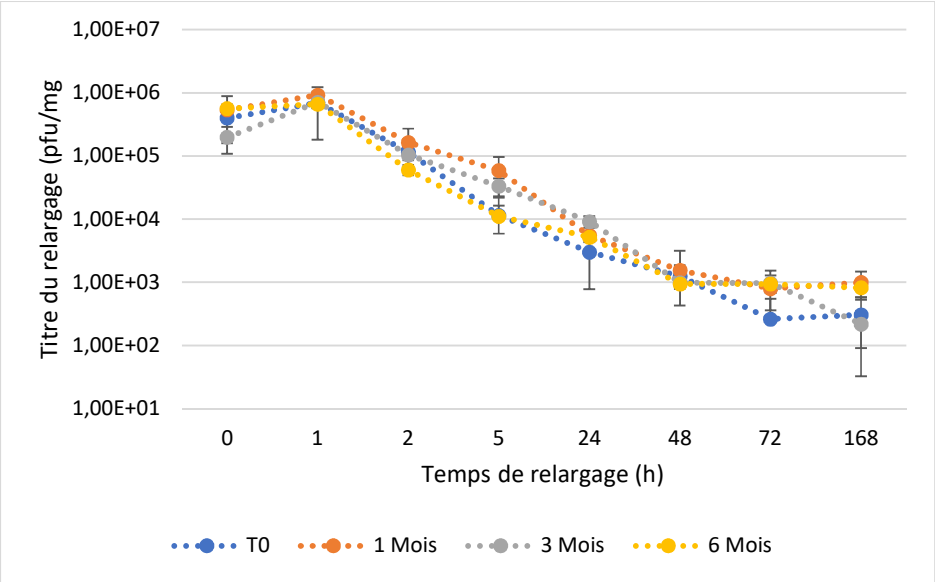

Figure 4.8 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

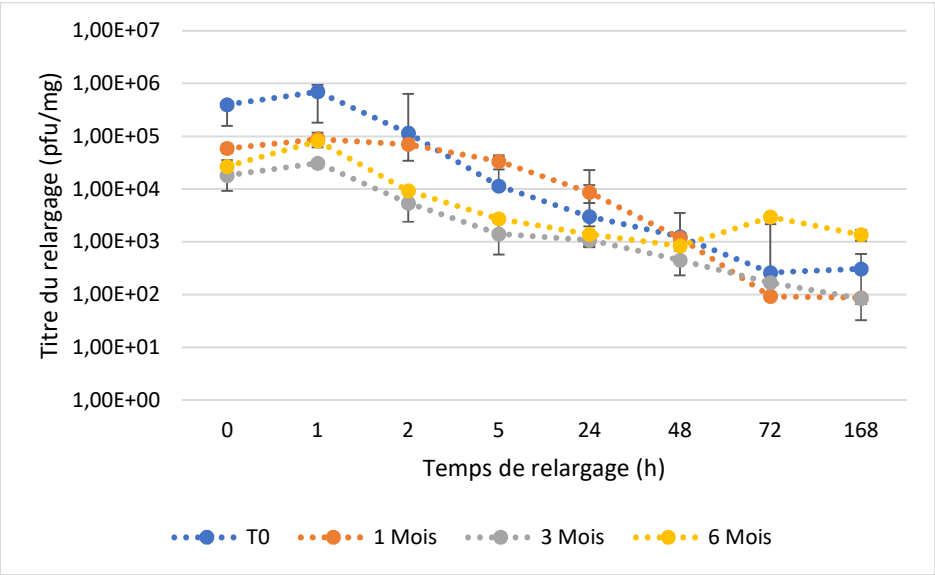

Figure 4.9 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose se à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Le relargage du patch **HB002** stocké à une température de 4°C, démontré sur la **figure 4.8**, est resté stable avec un titre de 10^5 pfu/ml de 0à 2h incubés à 37°C. Ensuite une dégradation de 1 log a été calculée à chaque temps de mesure jusqu'à une semaine avec un titre de 10^2 pfu/ml. En ce qui concerne la stabilité après chaque période de stockage, aucune différence significative n'a été relevée entre T0, 1 mois, 3 mois et 6 mois. La **figure 4.9** démontre les résultats du relargage du même patch, mais stocké à 26°C. Ici le relargage après une période de stockage de 1 mois et trois mois, les courbes étaient presque similaires. Avec une stabilité du titre à 10^4 pfu/ml de 0 à 2h, ensuite une chute de 1 log a été calculée après chaque période de stockage pour atteindre 10^1 pfu/ml après une semaine. Après 6 mois, le relargage a été partiellement identique à celui de 1 mois et 3 mois, seulement à une semaine le titre a augmenté de 2 logs. Ces diminutions et augmentations entre les différents points sont plus reliées à une erreur sur le titre due probablement à la densité optique (DO) des bactéries, si ces dernières étaient dans une phase exponentielle au moment du test; aussi la qualité du master plate peut créer une différence, mais non significative lorsqu'il est frais vs préparé depuis plusieurs jours.

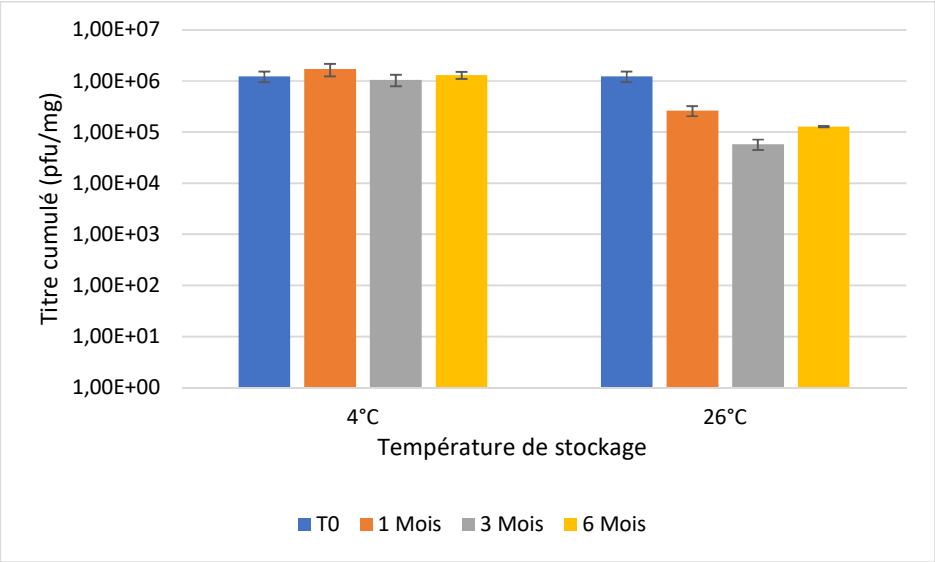

Figure 4.10 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.10** démontre la comparaison du relargage cumulé des patchs **HB002**, entre deux températures de stockage : 4°C et 26°C, suivis jusqu'à 6 mois. À T_0 le titre été similaire pour les deux échantillons 10^6 pfu/ml. Pour le stockage à 4°C, aucune perte n'a été dénombrée durant toute l'étude (6 mois). Contrairement à 26°C, une diminution graduelle de 1 log a été observée après chaque période de temps. Le résultat à 6 mois a connu une augmentation de presque 1 log.

HB003: 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000

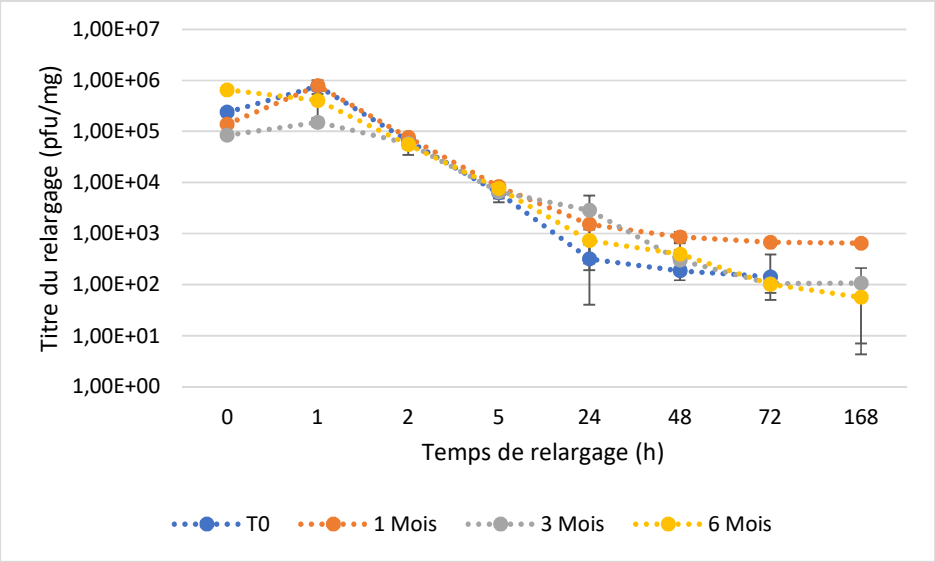

Figure 4.11 Le relargage du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000 à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

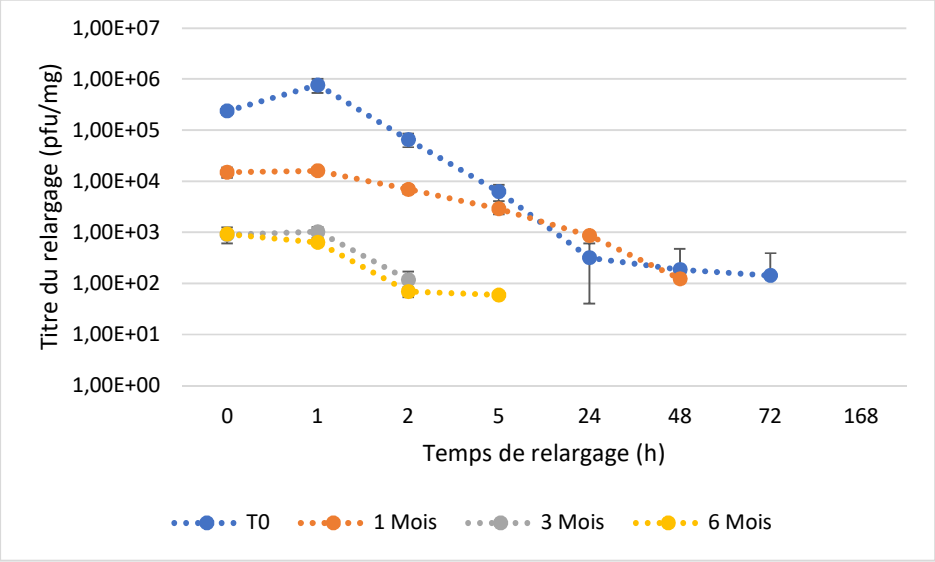

Figure 4.12 Le relargage du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000 à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Le relargage des patchs à base de bactériophages stockés à une température de 4°C est observé sur la **figure 4.11**. Le T_0 démontre un relargage qui s'amplifie graduellement et atteint son maximum avec un titre de 10^5 pfu/ml, à 1h d'incubation à 37°C. Une chute de 1 log a été dénombrée après chaque temps de mesure jusqu'à arriver à 10^1 pfu/ml pour 72h de relargage. Aucune activité lytique n'a été observée après une semaine. À 1 mois 3 mois et 6 mois, le relargage ici a suivi le même rythme qu'à T_0 sauf qu'à une semaine le titre a été calculé aux alentours de 10^2 pfu/ml. En parallèle, le stockage à 26°C, **figure 4.12**, le titre maximal atteint à 1 mois, était de 10^4 pfu/ml à 1h de relargage pour descendre à 10^2 pfu/ml après 48h. Arrivée à 72h et une semaine, aucune activité lytique n'a pu être calculée. Pour le relargage de 3 mois et 6 mois son maximum été 10^3 pfu/ml et 10^2 pfu/ml respectivement. Dès les 24h, l'absence de l'activité lytique a été observée.

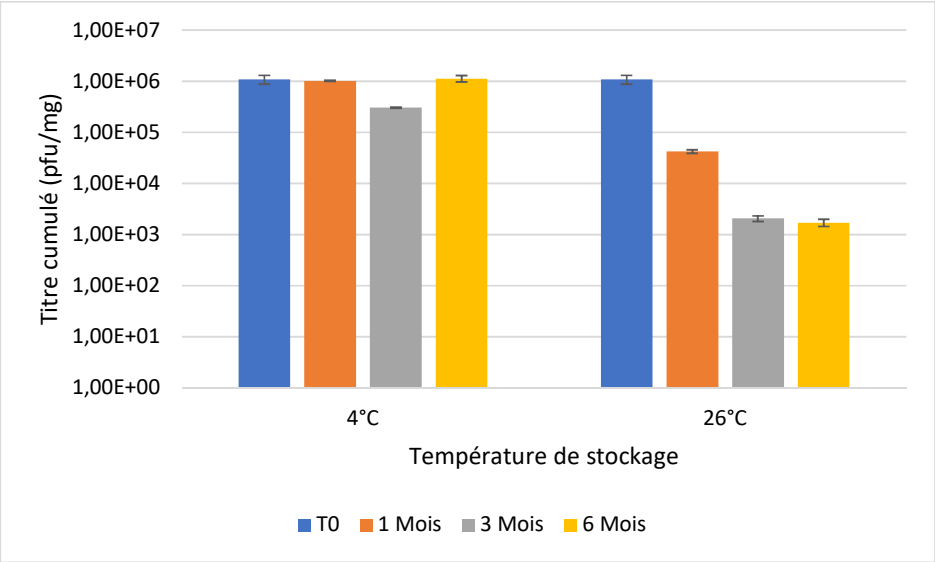

Figure 4.13 Relargage cumulé du patch SPK avec 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La comparaison des résultats du relargage cumulé des patchs préparés en utilisant 12mg/ml lactose + 5mg/ml PEG6000, stockés à 4°c et 26°C, a été représentée sur la **figure 4.13.** À T_0 le titre été

similaire pour les deux échantillons 10^6 pfu/ml. Après 1 mois de stockage, une perte de 2 logs a été calculée à 26°C tandis qu'aucune perte à 4°C. Dès 3 mois, une diminution de 1 log a été signalée pour les deux températures de stockage. Les titres prélevés à 6 mois étaient 10^6 pfu/ml et 10^3 pfu/ml pour 4°C et 26°C respectivement.

HB004 : 0,5M mannitol

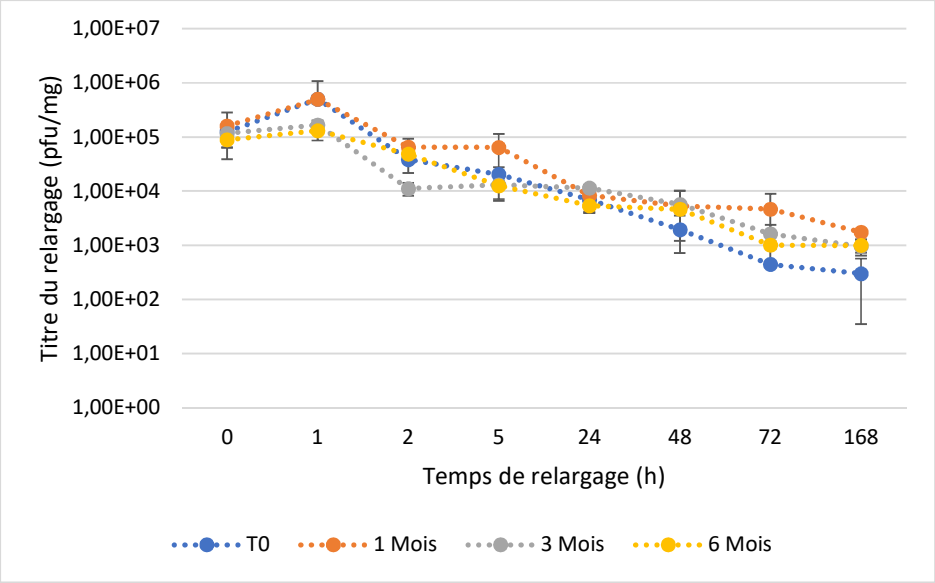

Figure 4.14 Le relargage du patch SPK avec 0,5M mannitol à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

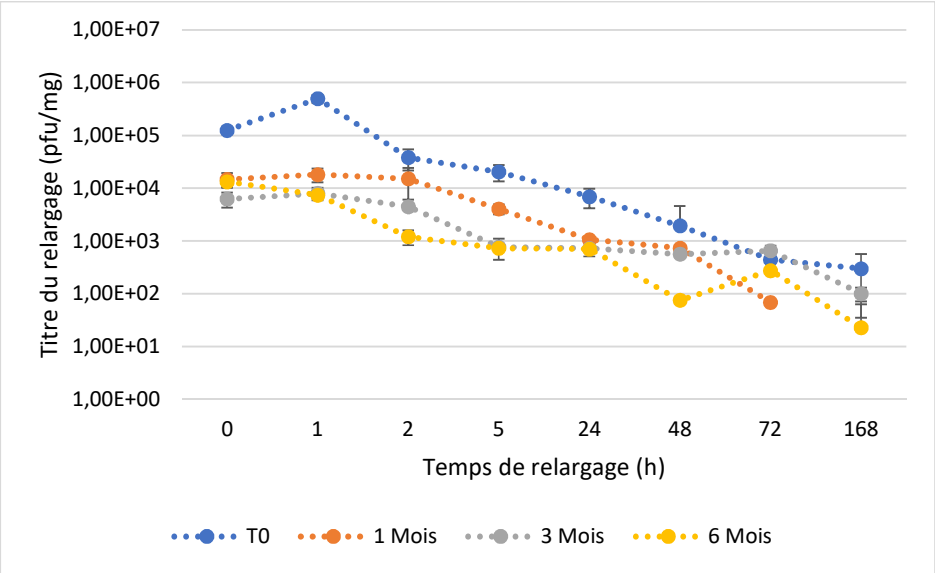

Figure 4.15 Le relargage du patch SPK avec 0,5M mannitol à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.14** démontre le relargage des patchs à base de bactériophages stockés à une température de 4°C. Les périodes T_0, 1 mois, 3 mois et 6 mois ont démontré un relargage qui s'amplifie graduellement et atteint son maximum avec un titre de 10^5 pfu/ml, à 1h d'incubation à 37°C. Une chute de 1 log a été calculée après chaque deux temps de mesure à partir de 2h jusqu'à arriver à 10^2 pfu/ml pour une semaine de relargage. Tandis qu'à un stockage à 26°C, **figure 4.15**, le titre maximal atteint à 1 mois été de 10^4 pfu/ml à 1h de relargage et 10^3 pfu/ml à 3 mois et 6 mois pour descendre aux alentours de 10^2 pfu/ml après 72h. Arrivé à une semaine, aucune activité lytique n'a pu être calculée à 1 mois de stockage, tandis qu'à 3 mois et 6 mois le titre a été calculé à 10^2 pfu/ml et 10^1 pfu/ml respectivement.

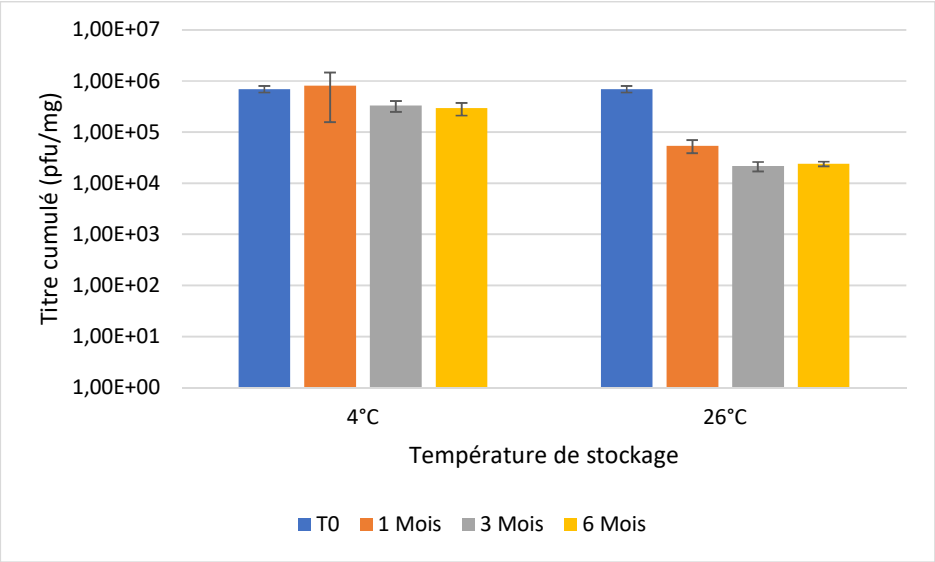

Figure 4.16 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,5M mannitol. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Le relargage des patchs faits avec des bactériophages lyophilisés en ajoutant 0.5 M de Mannitol à la formulation, a maintenu un titre de 10^5 pfu/ml durant toute la durée de stockage à 4°C (**figure 4.16**). En comparant avec les résultats du stockage à 26°C sur la même figure, une perte de 1 log a été observée après 1 mois de stockage. Un titre de 10^4 pfu/ml a été maintenu jusqu'à une période de 6 mois.

HB006 : 0,1M saccharose + 5% PEG6000

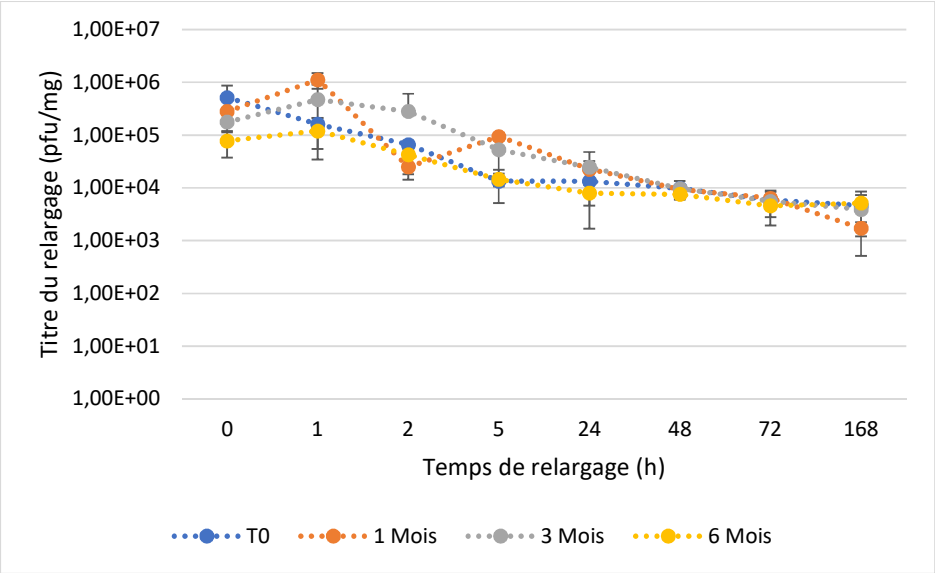

Figure 4.17 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000 à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

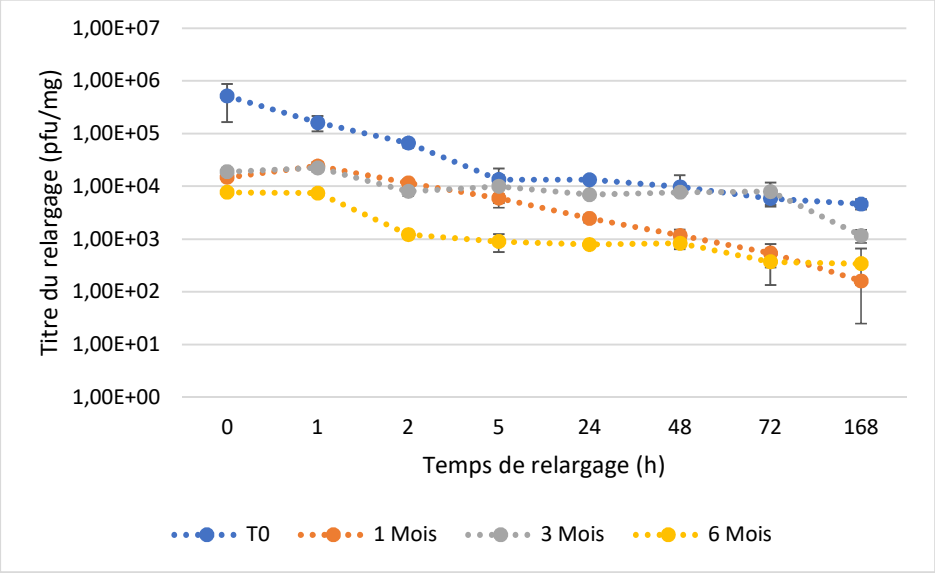

Figure 4.18 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000 à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.17** démontre le relargage des patchs à base de bactériophages stockés à une température de 4°C. Le relargage à T_0, 3 mois et 6 mois, a illustré une stabilité jusqu'à 1h de temps avec un titre de 10^5 pfu/ml qui diminue graduellement pour arriver à 10^3 pfu/ml après une semaine de relargage. À 1 mois, le relargage a atteint son maximum avec un titre de 10^6 pfu/ml, à 1h d'incubation à 37°C. Une chute de 1 log a été calculée après de 2h à 24h pour finir avec un titre de 10^3 pfu/ml après une semaine de relargage. Le stockage à 26°C quant à lui, a été démontré sur la **figure 4.18**, le relargage à T_0 est le même que celui de 4°C. Le titre maximal atteint à 1 mois et 3 mois été de 10^4 pfu/ml de 1h à 5h de relargage et 10^3 pfu/ml pour 6 mois, il chute ensuite aux alentours de 10^3 pfu/ml pour les périodes de 1 mois et 3 mois et 10^2 pfu/ml pour la période de 6 mois à partir de 24h jusqu'à une semaine.

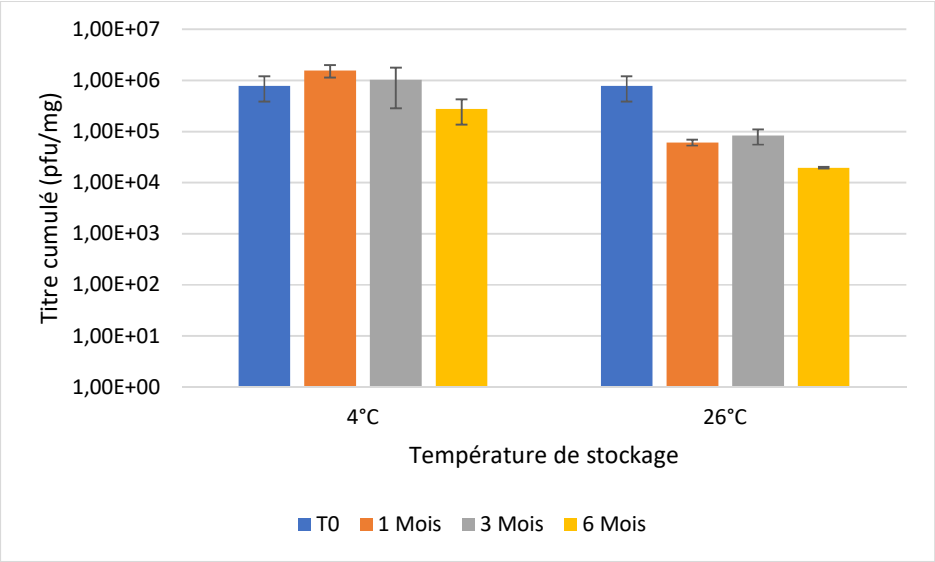

Figure 4.19 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose + 5% PEG6000. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.19** démontre la comparaison du relargage cumulé des patchs biodégradables à base de bactériophages, entre deux températures de stockage : 4°C et 26°C. Suivis jusqu'à 6 mois. Seulement après 6 mois de stockage, une perte de 1 log a été calculée à 4°C tandis qu'à 26°C, juste après 1 mois, une diminution de 1log a été signalée avec un titre de 10^4 pfu/ml. Ce titre a été préservé jusqu'à 6mois.

HB009: 0,1M saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium

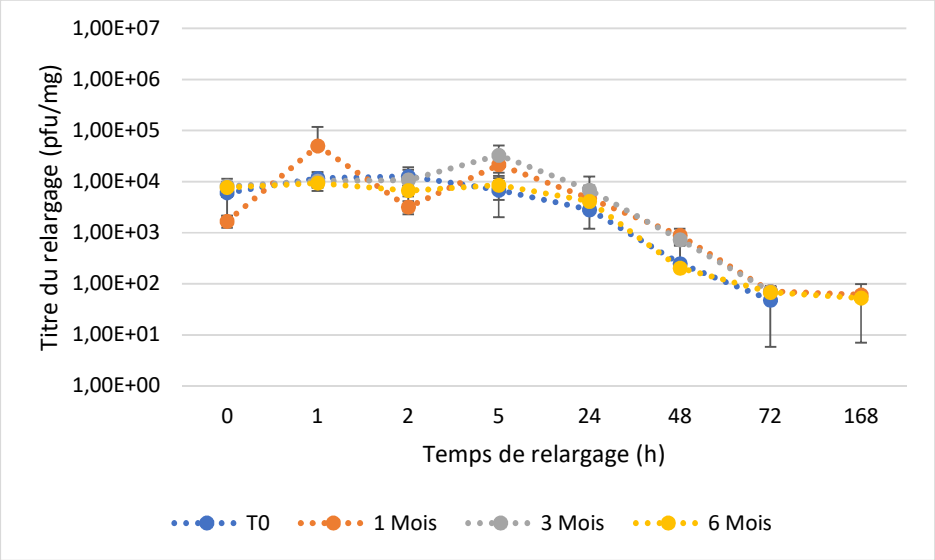

Figure 4.20 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

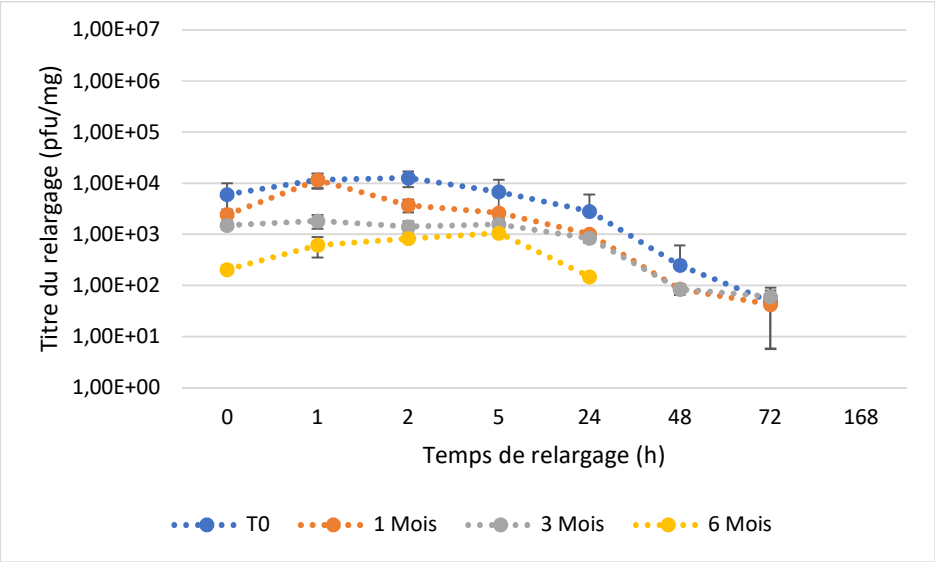

Figure 4.21 Le relargage du patch SPK avec saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Le relargage du patch **HB009** stocké à une température de 4°C, démontré sur la **figure 4.20**, est resté stable à un titre de 10^4 pfu/ml de 1h à 5h incubés à 37°C. Ensuite une dégradation de 1 log a été calculée à chaque temps de mesure jusqu'à 72h avec un titre de 10^1 pfu/ml pour toutes les périodes de stockage. Pour une semaine de relargage, seulement à 1 mois et 6 mois où le relargage a maintenu son titre à 10^1 pfu/ml. Aucune activité n'a été détectée pour les périodes T_0 et 3 mois à une semaine de relargage. La **figure 4.21** démontre les résultats du stockage à 26°C du même patch. Les titres maximaux du relargage après une période de stockage de 1 mois 3 mois et 6 mois, étaient de 10^4 pfu/ml, 10^3 pfu/ml et 10^2 pfu/ml respectivement à 1h. Dès les 2h de relargage jusqu'à 24h le titre été maintenu à 10^3 pfu/ml pour les périodes 1 mois et 3 mois. Une chute du titre a été calculée pour arriver à 10^1 pfu/ml à 72h, à une semaine aucune activité n'a été aperçue. Pour la période de 6 mois, le titre est resté stable aux alentours de 10^2 pfu/ml jusqu'à 24h, depuis plus d'activité jusqu'à la fin de l'étude.

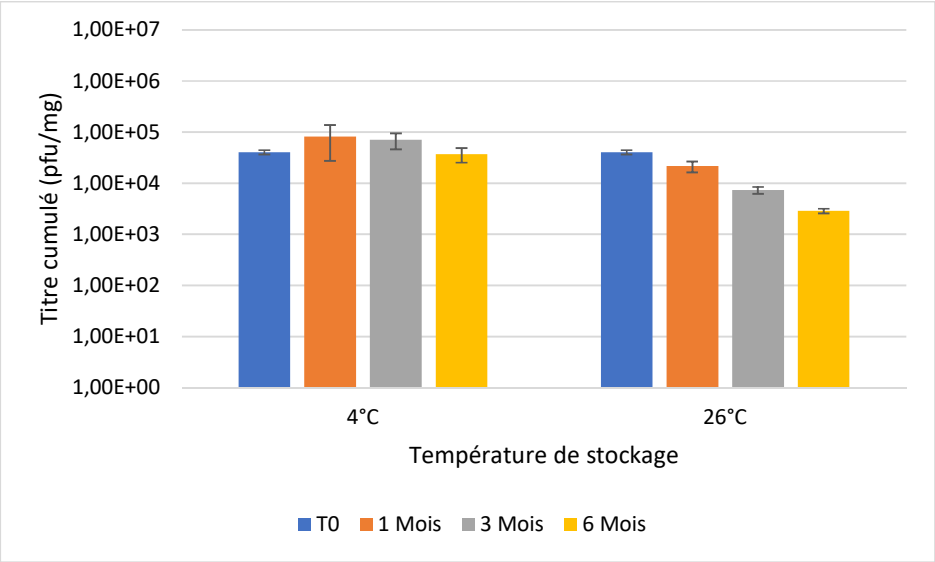

Figure 4.22 Relargage cumulé du patch SPK avec saccharose + 0,5% HPMC + 24mM phosphate de sodium. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Les résultats de relargage des patchs **HB009** entre deux températures de stockage : 4°C et 26°C ont été comparés sur la **figure 4.22**. Dès 3 mois, une diminution de 1log a été calculée à 26°C, ce titre a été préservé jusqu'à 6mois :10^3 pfu/ml. Tandis qu'aucune perte significative n'a été observée à 4°C pendant toute la durée de stockage. Le relargage cumulé à 1 mois et 3 mois sont plus élevés qu'à T0, probablement parce que la densité optique des bactéries était à son maximum ou bien le Master plate était fraîchement préparé.

HB010 : 0,1M saccharose + 0,5% HPMC

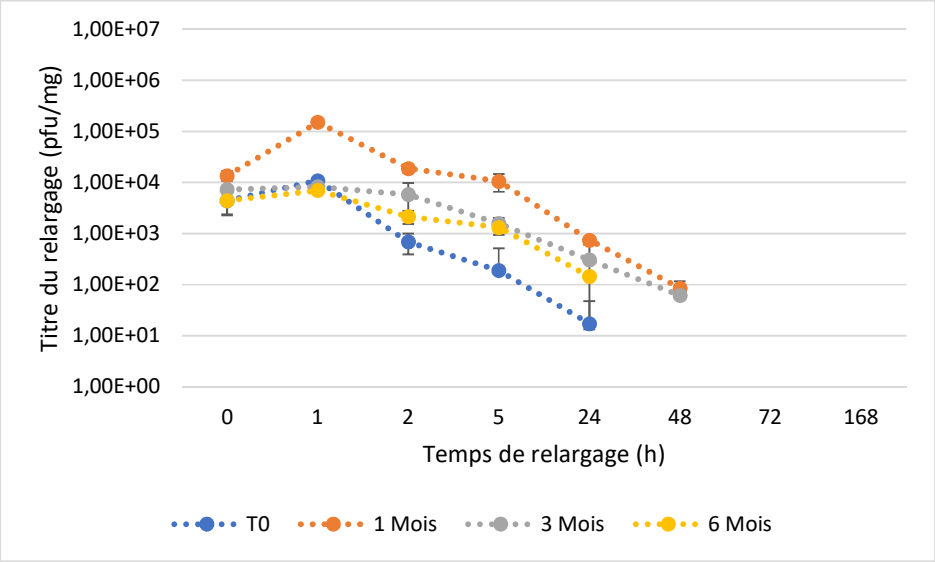

Figure 4.23 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC à un stockage de 4°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

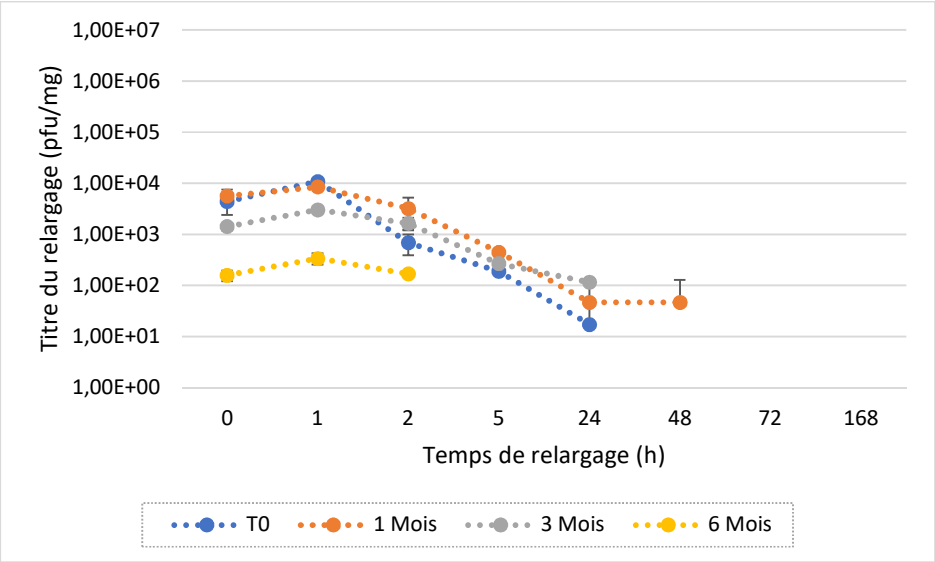

Figure 4.24 Le relargage du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC à un stockage de 26°C. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

La **figure 4.23** démontre le relargage des patchs à base de bactériophages lyophilisés avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC et stockés à une température de 4°C. Le relargage à T_0 a atteint son maximum à 1h avec un titre de 10^4 pfu/ml, une diminution progressive du titre a été calculée pour atteindre 10^1 pfu/ml à 24h. Aux temps 48h, 72h et une semaine aucune activité n'a pu être calculée. 1mois, 3 mois ont démontré un relargage qui s'amplifie graduellement et atteint son maximum avec un titre de 10^5 pfu/ml et 10^4 pfu/ml respectivement, à 1h d'incubation à 37°C. Une chute de 1 log a été calculée après chaque temps de mesure à partir de 2h jusqu'à arriver à 10^1 pfu/ml pour 48h de relargage et finir par un titre nul à 72h et une semaine. À 6 mois un titre stable de 10^3 pfu/ml a été maintenu jusqu'à 5h et fini par 10^2 pfu/ml à 24h où le relargage prend fin. La **figure 4.24** est associée aux résultats du stockage à 26°C. Le titre maximal atteint à 1 mois et 3 mois été de 10^3 pfu/ml à 1h de relargage pour descendre aux alentours de 10^2 pfu/ml après 24h. L'absence de l'activité a été signalée à partir de 48h pour 3 mois et seulement dès 72h pour 1 mois. Un arrêt prématuré du relargage a été illustré à la période de 6 mois avec un titre stable de 10^2 pfu/ml durant les premières 2h.

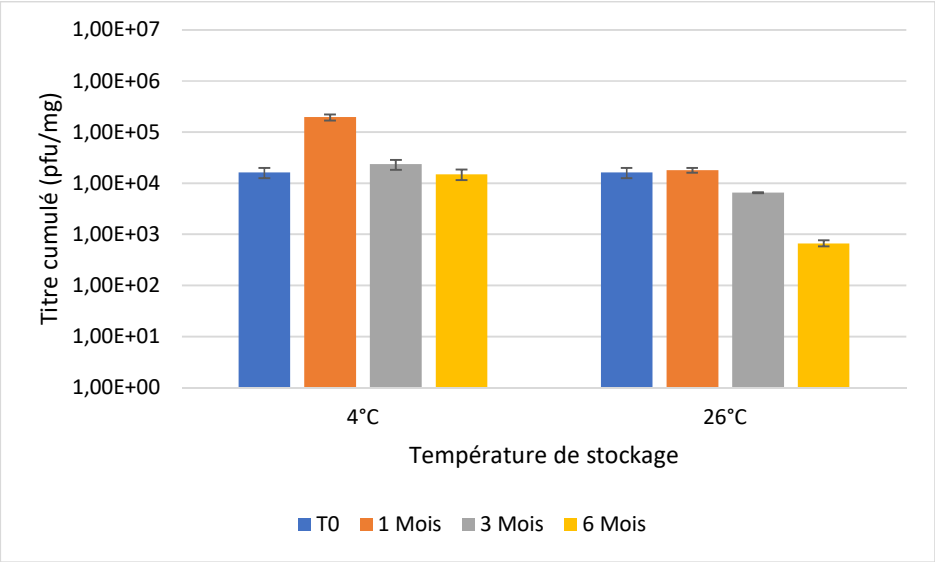

Figure 4.25 Relargage cumulé du patch SPK avec 0,1M saccharose + 0,5% HPMC. Données présentées sous forme de moyenne ± un écart type (n = 3).

Un titre de relargage à 10^4 pfu/ml a été maintenu jusqu'à 6 mois de stockage pour la température 4°C et seulement à 1 mois pour 26°C. Sur la **figure 4.25**, il a été observé qu'à un stockage de 26°C, une perte progressive du titre pour qu'il soit 10^3 pfu/ml à 3 mois de stockage et de 10^2 pfu/ml à 6 mois. . Le relargage cumulé à 1 mois a émis une donnée aberrante, probablement causée soit par la densité optique des bactéries ou bien par la préparation du Master plate de ces mêmes bactéries.

Tableau 4.2 Tableau récapitulatif des résultats des patchs

Le lot du patch #	**La formulation utilisée lors de la lyophilisation du SPK cocktail**	**Température de stockage (°C)**	**Perte d'activité après 6 mois de stockage**
HB001	11.1% Pullulant + 0.56 M Tréhalose	4°C	< 1 log
		26°C	< 2 log
HB002	0.1 M Saccharose	4°C	0 log
		26°C	< 1 log
HB003	12 mg/ml Lactose + 5 mg/ml PEG6000	4°C	0 log
		26°C	< 3 log
HB004	0.5 M Mannitol	4°C	< 1 log
		26°C	~ 1 log
HB006	0.1 M Saccharose + 5% PEG6000	4°C	< 1 log
		26°C	< 1 log
HB009	0.1 M Saccharose + 0.5% HPMC + 24 mM Phosphate de sodium	4°C	0 log
		26°C	~1 log
HB010	0.1 M Saccharose + 0.5% HPMC	4°C	< 1 log
		26°C	< 2 log

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les bactériophages peuvent se dégrader par des moyens chimiques ou physiques. Par conséquent, il était captivant de suivre cette étude. Pour vérifier la stabilité de l'activité lytique des bactériophages lyophilisés, la méthode de dénombrement de plaques de lyses a été utilisée. En ce qui concerne les patchs, en plus de l'activité lytique, le relargage des phages a été caractérisé.

5.1 Sélection des formulations et comparaison des cycles de lyophilisation

Plus d'une centaine de formulations ont été préparées et testées afin de sélectionner les meilleurs et sur lesquelles le suivre devrait s'effectuer. Le critère de sélection de ces formulations été la différence entre le titre avant et directement après lyophilisation qui ne devrait pas être supérieure à 1 log de perte. L'étude a été effectuée sur une durée d'une année de stabilité pour la plupart des formulations choisies. Seulement quelques-unes où le suivi de la stabilité des bactériophages s'est arrêté à 6 mois par manque d'échantillons. L'effet de différents excipients peut être expliqué par la comparaison de leur structure et de leur mécanisme de stabilisation.

Parmi les polymères d'encapsulation, le hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) en fait partie des meilleurs. Dans le monde de la lyophilisation des bactériophages, des formulations ont été préparées en utilisant le HPMC seul ou en association avec d'autres excipients. Selon Alfadhel et al., l'utilisation du HPMC seul à 1% et 2%, a entraîné une baisse du titre de presque 1 log immédiatement après lyophilisation et jusqu'à 4 logs de réduction sur une année de stockage à une température de 4°C [42]. En comparant nos résultats à cette étude, en utilisant 0.5% de HPMC, la perte était similaire directement après lyophilisation. Par contre sur une année de stockage à la même température, seulement une réduction d'un log a été observée. Pour cet excipient, la stabilité des bactériophages est probablement conférée par un encombrement moléculaire, un terme qui

réfère au fait que la concentration moléculaire totale à l'intérieur des cellules est très élevée, provoqué par la matrice du HPMC [96].

Le polyhydrique PEG6000, un polymère et un solvant non aqueux [79], est considéré comme étant l'un des cryoprotecteurs les plus utilisés et les plus efficaces. En l'associant au saccharose avec des préparations de 2% et 5% lors de la lyophilisation du cocktail SPK, il a maintenu une stabilité sans aucune perte observée à 2% sur une année de stockage. Tandis qu'une chute de seulement 1log a été calculée à 5%. La stabilité du phage ISP, un *myovirus* de *S.aureus*, a été suivie sur une durée de 37 mois par Merabishvili *et al*. Directement après lyophilisation, une diminution de 1.8 et 5 logs du titre initial a été observée pour les formulations de 1% et 5% de PEG600, respectivement. À la fin de l'étude, une perte de titre supplémentaire était de 3 logs (1% PEG) et 1.7 log (5% PEG). Ce qui leur a fait conclure que cet excipient était infructueux [26]. D'autre part, les résultats d'une autre étude ont démontré que la stabilité de l'activité lytique d'un bactériophage lyophilisé en présence de PEG6000 été médiocre au cours d'une période de 14 mois. Toutefois, le PEG semblait avoir des interactions hydrophobes avec les résidus protéiques non polaires ce qui a conduit à une déstabilisation du système [41]. Malgré cela, la stabilité du cocktail SPK, dans notre étude, était satisfaisante. Cette différence de résultat est probablement due soit à l'ajout du saccharose au PEG600 d'une part ou bien à l'effet de protection des bactériophages dans le cocktail.

Les sucres sont connus par leur capacité de ralentir les vois de dégradations des protéines à l'état solide ce qui les met en avant sur la liste des cryoprotecteurs. Leur mécanisme implique la vitrification lors de la congélation. La matrice de verre formée par ce phénomène empêche l'agrégation des bactériophages, ce qui les protège des contraintes mécaniques des cristaux de glace [79]. Parmi ces sucres, nous avons le Glucose et le Maltose qui ont révélé des résultats satisfaisants. Une perte de 1 log et 2 logs seulement sur une durée de 9 mois de stockage pour des concentrations

de 1 mg/ml et 0.05 mg/ml, respectivement. Ce qui fait que la formulation de 1 mg/ ml pour chaque sucre a été meilleure.

Le sucre alcool Mannitol étant un matériau non hygroscopique [97] et un lyoprotecteur lors de la lyophilisation de produits biopharmaceutiques complexes [98], fait de lui un des excipients de choix habituels pour la lyophilisation des bactériophages. Par contre, il est facilement cristallisé en comparant à d'autres sucres ce qui déstabilise certaines protéines lors de la lyophilisation. La plupart du temps, il est associé à d'autres stabilisants afin d'augmenter son efficacité [50]. Cependant, les résultats des concentrations de 0.1 M et 0.5 M de Mannitol utilisé dans cette étude, n'ont démontré aucune différence significative ($p>0.05$) avec une perte d'activité lytique de presque 2 logs après une année de stockage à 4°C. Aucune perte n'a été observée directement après lyophilisation avec 0.5 M de concentration et seulement 1 log de réduction à 0.1 M. Contrairement aux résultats mentionnés lors de l'étude effectuée par Merabishvili *et al*. qui a connu une perte complète de l'activité lytique de leur phage en utilisant le Mannitol à une concentration de 0.1 M et une réduction de 4 log à 0.5 M après lyophilisation. La stabilité a été maintenue avec ce titre jusqu'à 27 mois de stockage [26]. Une autre étude, a conclu que le Mannitol leur a servi seulement pour améliorer la résistance de leur produit lyophilisé en l'ajoutant au HPMC. Utilisé seul, le Mannitol a provoqué une perte de 6 logs directement après lyophilisation [42].

Selon la littérature, le saccharose offre une protection lyoprotectrice et aussi cryoprotectrice du fait de son exclusion préférentielle par les surfaces des protéines [99]. L'étude effectuée par Merabishvili *et al.* a conclu que le saccharose à des concentrations élevées (0.5 M) été l'un des stabilisants les plus efficaces pour le phage ISP avec une perte de 2 logs sur 37 mois de stockage [26]. Dans le cadre d'une autre étude, l'ajout du Saccharose avec une concentration de 0.5 M [41],

a provoqué une diminution de l'activité lytique du bactériophage. Tandis qu'avec une concentration plus faible (0.1 M) a maintenu une bonne activité lytique sur une période de 30 jours [41]. Un cocktail de phages lyophilisés en utilisant le saccharose seul ou combiné avec la gélatine et stockés à 4°C et 37°C, a maintenu sa viabilité jusqu'à 20 mois et 10 mois respectivement [100].

Effectivement, les données relatives à l'effet stabilisant du saccharose sur le cocktail SPK ont également prouvé son l'efficacité. Par contre, dépendamment de la concentration (0.1 M ou 0.5 M) ou du cycle de lyophilisation (P1, P2 ou P3), la perte ne dépassait pas 2 log sur une durée de stockage d'une année.

En général, parmi tous les sucres, le tréhalose se distingue comme cryoprotecteur par le fait qu'il est préféré par les biomolécules. Les raisons de cette préférence se résument en l'absence de liaisons internes à l'hydrogène qui permet une formation plus flexible des liaisons hydrogènes avec les protéines lors de la lyophilisation, son hygroscopicité minimale (la propriété d'absorber l'humidité de l'air) et sa température de transition vitreuse élevée [79]. L'effet du tréhalose sur le cocktail SPK a démontré une perte de moins d'un log sur une durée de 6 mois de stockage avec les deux concentrations 0.1 m et 0.5 M. Ce qui rejoint les résultats révélés par l'étude effectuée sur le phage ISP, par Merabishvili et al. avec une concentration de 0.5 M [26].

Les petits sucres conviennent le mieux pour obtenir une meilleure liaison hydrogène et réduire la mobilité locale. Par contre, pour une bonne vitrification, également nécessaire, l'utilisation des gros sucres (oligo et polysaccharides) est recommandée [101].

Par conséquent, un certain équilibre doit être trouvé. Si une Tg plus élevée est souhaitée, idéalement une combinaison d'un polysaccharide tel que le Pullulant avec un disaccharide plus petit, le Tréhalose sera utilisé. De cette façon, le Tréhalose se charge de former des interactions et réduire la mobilité locale et le Pullulant contribue à l'augmentation de la température de la transition

vitreuse grâce à sa Tg qui est relativement plus élevée. Une étude de stabilité d'une protéine (lysozyme) a été réalisée dernièrement en utilisant la combinaison Tréhalose/Pullulant. Ses résultats ont démontré qu'aucune perte d'activité de cette protéine n'a été observée sur une durée de 4 semaines [90]. Toutefois, notre cocktail SPK a maintenu une bonne stabilité de son activité après lyophilisation avec la formulation de 11.1% Pullulant + 0.56 M Tréhalose. Sauf que la différence des cycles utilisés a démontré une légère différence, mais non significative (P>0.05) de stabilité. L'échantillon lyophilisé en utilisant le cycle P4, était plus stable avec une perte de 1 log seulement après une année de stockage. Tandis qu'avec le cycle P3, une réduction de 2 logs a été observée. Cette différence est probablement liée à la vitesse de la congélation dans le cycle P4 qui a permis d'avoir une cristallisation rapide.

Pour conclure, aucune différence significative particulière (P>0.05) n'a pu être observée entre les formulations et les titres de bactériophages. De plus, en comparant le comportement du cocktail SPK avec les études effectuées sur les différents phages en littérature, l'activité lytique du cocktail est restée stable en utilisant plusieurs formulations et/ ou cycles de lyophilisation ayant été infructueux avec les phages de différentes études. Ce qui confirme la conclusion d'Ackermann et al. qu'il faut connaître son phage, parce que leur comportement n'est pas identique même s'ils ont subi les mêmes circonstances [40]. Cependant, il est clair que notre cocktail SPK est facilement stocké après lyophilisation à une température 4°C en utilisant une des précédentes formulations. Quoi que, il est recommandé d'utiliser le P4 comme cycle de lyophilisation pour sa stabilité et rapidité, ce qui réduit les coûts en réduction de temps de lyophilisation.

Les bactériophages lyophilisés ont été réalisés afin de les appliquer dans des matrices de polymères biodégradables qu'on a nommé patchs. C'est pourquoi, la vérification de l'aspect

physique des lyophilisats n'était pas vraiment importante dans ce cas, vu que ce n'était pas le produit final. De plus, aucun autre test n'a été appliqué tel que la TGA, la DSC, XRD et la TEM.

5.2 Application des phages lyophilisés dans des patches

Parmi les meilleures formulations utilisées en lyophilisation, quelques-unes ont été appliquées dans la préparation des patchs. Cependant, suivant le protocole, les échantillons lyophilisés ont été ajoutés aux polymères biodégradables afin de former une matrice. Cette dernière doit respecter quelques caractéristiques physico-chimiques. Ces patchs ouvrent la voie au ciblage passif et à la libération contrôlée de bactériophages susceptibles de faciliter les applications cliniques pour le traitement des plaies de brûlures infectées. Une étude clinique effectuée dernièrement indique que la thérapie des brûlures de la peau par les cocktails de bactériophages a un potentiel favorable [102].

La stabilité de l'activité lytique des sept patchs à une température de stockage de 4°C a été maintenue durant les 6 mois avec aucune perte significative du titre cumulatif. Ce qui prouve que la matrice n'a pas affecté les bactériophages. Par contre à 26°C, une perte au moins d'un log a été observée au cours de cette période. Quoique, cette perte reste négligeable en comparant avec d'autres travaux qui ont montré que la demi-vie du bactériophage λ à 20°C était de 20 jours [103]. Ce qui confirme que le cocktail SPK est plus sensible à un stockage de 26°C qu'à 4°C ; par contre, il résiste assez bien à l'encapsulation dans une matrice biodégradable.

Dans le contrôle temporel et pour un but thérapeutique, les systèmes d'administration de médicaments visent à administrer le médicament sur une durée prolongée [104]. C'est alors que, la libération contrôlée est bénéfique pour la phagothérapie dans notre cas. C'est pour cette raison que le suivi du relargage de différents patchs a été effectué pendant une semaine pour chaque point de stabilité en deux températures de stockage. D'une part pour vérifier la stabilité des formulations intégrées dans la matrice biodégradable, et d'autre part pour vérifier si ces formulations ne modifient pas le comportement du relargage contrôlé établi par la matrice. Tous les patchs assurant la libération prolongée de bactériophages se sont révélés efficaces à une température de stockage de 4°C, sauf le **HB010** dont le relargage s'est arrêté à 24h de temps. Par contre à 26°C seulement les patchs **HB001**, **HB002**, **HB004** et **HB006** se sont distingués avec un relargage qui dure jusqu'à une semaine. Donc c'est la température du stockage qui a affecté le contrôle de la libération des

bactériophages en agissant sur la stabilité de ces derniers. Il a été observé que l'ajout du phosphate de sodium au patch **HB009** aide à prolonger la durée de conservation des bactériophages en comparant avec le patch **HB010** qui est constitué avec des phages lyophilisés en utilisant seulement du saccharose et du HPMC. Sachant que ce sel augmente la durée de la conservation de la nourriture et maintient sa texture et son apparence lors de son ajout [105]. Pour le patch **HB001** constitué de la combinaison Pullulant / Tréhalose, malgré la stabilité de son activité lytique et la bonne durée de son relargage, la viscosité de la formulation a modifié les caractéristiques physiques du patch (transparence et adhésion à la peau). Ce qui élimine cette formulation des choix indépendamment de ses fructueux résultats.

C'est donc, les patchs suivants **HB002**, **HB004** et **HB006** en utilisant les formulations 0,1M Saccharose, 0,5M Mannitol et 0,1M Saccharose + 5% PEG6000 respectivement, qui sont les plus efficaces pour la stabilité sur 6 mois à deux températures de stockage (4°C et 26°C), ainsi que pour la durée du relargage qui a maintenu une activité lytique jusqu'à une semaine.

Suite aux essais expérimentaux basés sur une méthode d'essai erreur, nous avons parvenus à sélectionner une dizaine de formulations aptes à préserver le cocktail SPK lors du stockage après lyophilisation. Les quatre cycles de lyophilisation utilisés dans cette étude ont été fructueux avec différents d'additifs. Finalement, les formulations de bactériophages lyophilisés les plus stables ont été utilisées pour la préparation des patchs. Le grand nombre de tests de stabilité effectués pour cette étude, aurait largement affecter les erreurs liées à la pratique. De plus, le temps limité pour cette étude ne nous a pas permis d'approfondir la recherche et vérifier les caractéristiques physicochimiques des lyophilisats. Autrement, pour améliorer la qualité des résultats et réduire le temps expérimental alloué au test de stabilité, l'utilisation de la titration automatique est fortement recommandée. D'autre part, Il serait souhaitable de vérifier et comparer la stabilité du cocktail lyophilisé aux deux températures de stockage (4°C et 26°C), tel effectué avec les patchs.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les antibiotiques ont émergé le monde de la médecine dans le but de combattre les infections bactériennes. Malheureusement, l'utilisation abusive de ces agents antibactériens a créé une nouvelle problématique et un grand défi qui est la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Cependant, les chercheurs ont mis l'accent sur la découverte de nouvelles solutions afin de réduire l'effet morbide des infections bactériennes résistantes. Comme alternatifs, les bactériophages ont prouvé leur efficacité. En revanche, leur préparation pharmaceutique la plus présente sur le marché est sous forme liquide. Sous cette forme, la stabilité des bactériophages est limitée en moyenne à une année de stockage à 4°C.

Conformément aux études de stockage à long terme, les phages se stabilisent à la lyophilisation en présence de certains excipients avec certaines concentrations. À ce stade, il devrait être clair qu'il n'existe pas une seule théorie intégratrice qui explique entièrement la façon dont les excipients stabilisent les bactériophages. Ceci est essentiellement dû à la multitude de voies de dégradation potentielles existantes, différentes pour chaque phage. De plus, et de façons différentes, ils sont affectés par diverses conditions de stress liés aux cycles de lyophilisation.

L'objectif de ce travail était de stabiliser le cocktail SPK à moyen et à long terme pour des applications thérapeutiques sous forme de matrices biodégradables appelées patchs. Dans le but de sélectionner les bons additifs pour protéger les bactériophages contre les stress de lyophilisation, une préparation de plus d'une centaine de formulations a été réalisée. Différents cycles de lyophilisations ont été établis afin de couvrir un large spectre de formulations utilisées dans cette étude. Cependant, seulement les formulations qui ont permis de maintenir le titre d'activité lytique initial avec une perte maximale de 1 log directement après lyophilisation, ont été sélectionnées

pour la suite de l'expérimentation. Le Tréhalose, le Saccharose et le Mannitol (les deux concentrations : 0.1M et 0.5M), le Maltose (1 mg/ml), le PEG600 à 2% en présence du Saccharose et la combinaison Pullulant/ Tréhalose semblent efficaces, avec une perte d'un seul log durant toute une année de stockage à 4°C. Malgré que la différence entre les cycles fût non significative, le cycle P4 sera recommandé pour sa rapidité. Ce qui pourrait minimiser les coûts avec un temps de lyophilisation réduit. L'obtention d'un lyophilisat élégant de bactériophages, n'était pas parmi les objectifs parce que notre produit final était un patch constitué de phages lyophilisés.

Les patchs préparés avec le cocktail SPK lyophilisé, ont fait l'objet de l'étude du relargage des bactériophages, en parallèle de leur stabilité. Les patchs **HB001**, **HB002**, **HB004** et **HB006** préparés avec les formulations suivantes : 11,1% Pullulant + 0,56M Tréhalose, 0,1M Saccharose, 0,5M Mannitol et 0,1M Saccharose + 5% PEG6000 respectivement, ont été stables pendant 6 mois pour les deux températures de stockage 4°C et 26°C avec un relargage qui dure jusqu'à une semaine. Toutefois, la combinaison Pullulant/ Tréhalose a modifié les caractéristiques physico-chimiques du patch (transparence, adhésion et rigidité) ce qui l'élimine des choix malgré ses bons résultats. C'est alors qu'on se retrouve avec les trois meilleurs patchs : **HB002**, **HB004** et **HB006**.

La vérification de la qualité du lyophilisat (physico-chimique, aspect visuel,..) nécessite des études supplémentaires, éventuellement la température d'effondrement pendant la lyophilisation et la surveillance de la teneur en humidité résiduelle. Cela n'a pas été testé dans cette étude, mais il peut être fondamental pour les études de stabilité. En revanche, afin de compléter cette étude, le cocktail SPK devra être analysé par une TEM (Transmission Electron Microscopy) après lyophilisation pour vérifier l'état et la morphologie des bactériophages (structure affectée par la lyophilisation ou non). La microstructure des lyophilisats obtenus pourrait fournir des informations additionnelles sur l'efficacité des cycles de lyophilisation optimisés. Une comparaison des températures de

transition vitreuses Tg aurait été utile en utilisant la Calorimétrie différentielle à balayage (DSC); Pour déterminer si l'un des lyoprotectants était plus avantageux pour le développement des formulations subséquentes. Aussi, il serait important de caractériser la transition vitreuse (Tg) des produits finaux afin d'avoir une estimation de la température maximale à laquelle ils peuvent être entreposés. La diffraction des rayons X aiderait à indiquer la cristallisation des excipients par observation visuelle de l'effondrement, sachant que les lyophilisats amorphes sont thermodynamiquement instables, avec un risque élevé de recristallisation lorsqu'elles sont exposées à l'humidité car l'eau agit comme un plastifiant abaissant ainsi sa Tg.

En résumé, les formulations proposées préservent le cocktail SPK pendant et après lyophilisation stocké à 4°C pendant une période d'une année. Permettant ainsi de préparer des patchs stables avec une durée de relargage acceptable qu'on peut stocker à 4°C et/ou à 26°C. Ces patchs à base de bactériophages sont plus faciles à transporter et à appliquer que leurs homologues liquides, ce qui les rend plus viables comme méthode d'administration. Donc, le processus semble être fortement dépendant des phages.

Nous démontrons alors que le cocktail SPK résiste assez bien à la lyophilisation et à l'encapsulation dans des matrices biodégradables. Cette expérimentation ouvre la voie au ciblage passif et à la libération contrôlée de bactériophages dédiés à faciliter les applications cliniques plus vaste pour la phagothérapie.

RÉFÉRENCES

[1] D. J. Malik *et al.*, "Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy," *Adv Colloid Interface Sci,* vol. 249, pp. 100-133, Nov 2017.

[2] D. L. Mayers, J. D. Sobel, M. Ouellette, K. S. Kaye, and D. Marchaim, *Antimicrobial drug resistance: clinical and epidemiological aspects*. Springer, 2017.

[3] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J Pharm Anal,* vol. 6, no. 2, pp. 71-79, Apr 2016.

[4] R. Smith-Bindman, "Is computed tomography safe?," *N Engl J Med,* vol. 363, no. 1, pp. 1-4, Jul 1 2010.

[5] I. Martin, P. Sawatzky, G. Liu, and M. R. Mulvey, "Antimicrobial resistance to Neisseria gonorrhoeae in Canada: 2009-2013," (in eng), *Can Commun Dis Rep,* vol. 41, no. 2, pp. 35-41, Feb 5 2015.

[6] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, and C. Page, "The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs," *Nat Rev Drug Discov,* vol. 1, no. 11, pp. 895-910, Nov 2002.

[7] J. J. C. M. Powers and Infection, "Antimicrobial drug development–the past, the present, and the future," vol. 10, pp. 23-31, 2004.

[8] P. N. Malani, "Lefamulin—A New Antibiotic for Community-Acquired Pneumonia," *JAMA,* 2019.

[9] A. R. Coates, G. Halls, and Y. Hu, "Novel classes of antibiotics or more of the same?," *Br J Pharmacol,* vol. 163, no. 1, pp. 184-94, May 2011.

[10] OMS. De nouvelles données révèlent l'existence de niveaux élevés de résistance aux antibiotiques dans le monde. Retrieved 8 November 2019, [Online]. Available: https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/fr/

[11] L. Czaplewski *et al.*, "Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio Lancet Infect Dis, vol. 16, no. 2, pp. 239-251, 2016/02/01/ 2016.

[12] T. Al Saati and P. Brousset, "Données récentes sur la production d'anticorps monoclonaux à visée diagnostique en histopathologie," *Revue Francophone des Laboratoires,* vol. 2010, no. 418, pp. 51-55, 2010/01/01/ 2010.

[13] L. Hua *et al.*, "Assessment of an anti-alpha-toxin monoclonal antibody for prevention and treatment of Staphylococcus aureus-induced pneumonia," *Antimicrob Agents Chemother,* vol. 58, no. 2, pp. 1108-17, 2014.

[14] S. Palliyil, C. Downham, I. Broadbent, K. Charlton, and A. J. Porter, "High-sensitivity monoclonal antibodies specific for homoserine lactones protect mice from lethal Pseudomonas aeruginosa infections," *Appl Environ Microbiol,* vol. 80, no. 2, pp. 462-9, Jan 2014.

[15] L. Bo *et al.*, "Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia," *Cochrane Database Syst Rev,* no. 10, p. CD009066, Oct 25 2014.

[16] K. Kotzampassi and E. J. Giamarellos-Bourboulis, "Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation," *Int J Antimicrob Agents,* vol. 40, no. 4, pp. 288-96, Oct 2012.

[17] J. Villena and H. Kitazawa, "Modulation of Intestinal TLR4-Inflammatory Signaling Pathways by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from Lactobacillus jensenii TL2937," (in English), *Front Immunol,* Review vol. 4, no. 512, p. 512, Jan 14 2014.

[18] L. M. Hampton *et al.*, "Prevention of antibiotic-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae with conjugate vaccines," *J Infect Dis,* vol. 205, no. 3, pp. 401-11, Feb 1 2012.

[19] A. A. Palmu *et al.*, "Effect of pneumococcal Haemophilus influenzae protein D conjugate vaccine (PHiD-CV10) on outpatient antimicrobial purchases: a double-blind, cluster randomised phase 3–4 trial," Lancet Infect Dis*,* vol. 14, no. 3, pp. 205-212, 2014/03/01/ 2014.

[20] S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections," *Bacteriophage,* vol. 1, no. 2, pp. 66-85, Mar 2011.

[21] H. Anany, W. Chen, R. Pelton, and M. W. Griffiths, "Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes," (in English), *Appl Environ Microbiol,* vol. 77, no. 18, pp. 6379-87, Sep 2011.

[22] E. Jonczyk, M. Klak, R. Miedzybrodzki, and A. Gorski, "The influence of external factors on bacteriophages--review," *Folia Microbiol (Praha),* vol. 56, no. 3, pp. 191-200, May 2011.

[23] T. Yata, N. Nianiaris, S. Songsivilai, and A. Hajitou, "Bacteriophage," in *Gene Therapy of Cancer*, E. C. Lattime and S. L. Gerson, Eds. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 479-490.

[24] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne, and D. S. Katayama, "Stability of protein pharmaceuticals: an update," *Pharm Res,* vol. 27, no. 4, pp. 544-75, Apr 2010.

[25] M. A. Mensink, H. W. Frijlink, K. V. Maarschalk, and W. L. J. Hinrichs, "How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions," (in English), Eur J Pharm Biopharm*,* vol. 114, pp. 288-295, May 2017.

[26] M. Merabishvili *et al.*, "Stability of Staphylococcus aureus phage ISP after freeze-drying (lyophilization)," *PLoS One,* vol. 8, no. 7, p. e68797, 2013.

[27] B. Y. Lee *et al.*, "Economic impact of thermostable vaccines," *Vaccine,* vol. 35, no. 23, pp. 3135-3142, May 25 2017.

[28] D. Jikia *et al.*, "The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant Staphylococcus aureus-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90," *Clin Exp Dermatol,* vol. 30, no. 1, pp. 23-6, Jan 2005.

[29] U. Puapermpoonsiri, J. Spencer, and C. F. van der Walle, "A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres," *Eur J Pharm Biopharm,* vol. 72, no. 1, pp. 26-33, May 2009.

[30] L. Golshahi, K. H. Lynch, J. J. Dennis, and W. H. Finlay, "In vitro lung delivery of bacteriophages KS4-M and PhiKZ using dry powder inhalers for treatment of Burkholderia cepacia complex and Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis," *J Appl Microbiol,* vol. 110, no. 1, pp. 106-17, Jan 2011.

[31] E. S. Sanderson, "Effect of Freezing and Thawing on the Bacteriophage," *Science,* 10.1126/science.62.1608.377 vol. 62, no. 1608, p. 377, Oct 23 1925.

[32] T. M. Rivers, "effect of repeated freezing (-185 degrees c.) And thawing on colon bacilli, virus iii, vaccine virus, herpes virus, bacteriophage, complement, and trypsin," *J Exp Med,* 10.1084/jem.45.1.11 vol. 45, no. 1, pp. 11-21, Jan 1 1927.

[33] M. L. Campbell-Renton, "Experiments on drying and on freezing bacteriophage," The J Pathol Bacteriol*,* vol. 53, no. 3, pp. 371-384, 1941.

[34] W. A. Clark, "Comparison of Several Methods for Preserving Bacteriophages," Appl Microbiol, vol. 10, no. 5, p. 466, 1962.

[35] W. A. Clark, W. Horneland, and A. G. Klein, "Attempts to Freeze Some Bacteriophages to Ultralow Temperatures," Appl Microbiol*,* vol. 10, no. 5, p. 463, 1962.

[36] J. S. Meyle and J. E. Kempf, "Preservation of T₂ Bacteriophage With Liquid Nitrogen," Appl Microbiol*,* vol. 12, no. 5, p. 400, 1964.

[37] J. Davies, M. J. E. Kelly, and Infection, "The preservation of bacteriophage H1 of Corynebacterium ulcerans U 103 by freeze-drying,", Epidemiology & Infection, vol. 67, no. 4, pp. 573-583, 1969.

[38] A. Shapira and A. Kohn, "The effects of freeze-drying on bacteriophage T4," *Cryobiology,* vol. 11, no. 5, pp. 452-64, Oct 1974.

[39] C. H. Zierdt, "Stabilities of lyophilized Staphylococcus aureus typing bacteriophages," *Appl Environ Microbiol,* vol. 54, no. 10, p. 2590, Oct 1988.

[40] H.-W. Ackermann, D. Tremblay, and S. J. W. N. Moineau, "Long-term bacteriophage preservation,", WFCC Newsletter*,* vol. 38, no. 1, pp. 35-40, 2004.

[41] U. Puapermpoonsiri, S. J. Ford, and C. F. van der Walle, "Stabilization of bacteriophage during freeze drying," *Int J Pharm,* vol. 389, no. 1-2, pp. 168-75, Apr 15 2010.

[42] M. Alfadhel, U. Puapermpoonsiri, S. J. Ford, F. J. McInnes, and C. F. van der Walle, "Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for Staphylococcus aureus: in vitro evaluation," *Int J Pharm,* vol. 416, no. 1, pp. 280-7, Sep 15 2011.

[43] S. S. Leung *et al.*, "Production of Inhalation Phage Powders Using Spray Freeze Drying and Spray Drying Techniques for Treatment of Respiratory Infections," *Pharm Res,* vol. 33, no. 6, pp. 1486-96, Jun 2016.

[44] S. Matinkhoo, K. H. Lynch, J. J. Dennis, W. H. Finlay, and R. Vehring, "Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections," *J Pharm Sci,* vol. 100, no. 12, pp. 5197-205, Dec 2011.

[45] D. Vandenheuvel, A. Singh, K. Vandersteegen, J. Klumpp, R. Lavigne, and G. Van den Mooter, "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat

pulmonary bacterial infections," *Eur J Pharm Biopharm,* vol. 84, no. 3, pp. 578-82, Aug 2013.

[46] R. Y. Chang *et al.*, "Production of highly stable spray dried phage formulations for treatment of Pseudomonas aeruginosa lung infection," *Eur J Pharm Biopharm,* vol. 121, pp. 1-13, Dec 2017.

[47] C. Dini and P. J. de Urraza, "Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage," *Cryobiology,* vol. 66, no. 3, pp. 339-42, Jun 2013.

[48] A. Skaradzińska *et al.*, "Potential application of lyophilization in commercial use of bacteriophage preparations in veterinary medicine," , *Slovenian Veterinary Research,*vol. 55, no. 2, 2018.

[49] Y. Zhang, X. Peng, H. Zhang, A. B. Watts, and D. Ghosh, "Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations," *Int J Pharm,* vol. 542, no. 1-2, pp. 1-7, May 5 2018.

[50] W. Wang, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," *Int J Pharm,* vol. 203, no. 1-2, pp. 1-60, Aug 10 2000.

[51] J. F. Carpenter, M. J. Pikal, B. S. Chang, and T. W. Randolph, "Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice," *Pharm Res,* vol. 14, no. 8, pp. 969-75, Aug 1997.

[52] M. A. Moretton, D. A. Chiappetta, and A. Sosnik, "Cryoprotection-lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles," *J R Soc Interface,* vol. 9, no. 68, pp. 487-502, Mar 7 2012.

[53] X. Bertrand, Y. Costa, and P. Pina, "[Surveillance of antimicrobial resistance of bacteria isolated from bloodstream infections: data of the French National Observatory for Epidemiology of Bacterial Resistance to Antibiotics (ONERBA), 1998-2003]," *Med Mal Infect,* vol. 35, no. 6, pp. 329-34, Jun 2005. Surveillance de la resistance bacterienne aux antibiotiques dans les bacteriemies: donnees de l'observatoire national de l'epidemiologie de la resistance bacterienne aux antibiotiques (ONERBA) 1998-2003.

[54] G. German *et al.*, "Énoncé canadien définissant la multi-résistance et l'ultra-résistance chez les souches d'entérobactéries, d'Acinetobacter spp. et de Pseudomonas aeruginosa pour les laboratoires médicaux,", Relevé des maladies transmissibles au Canada, vol. 44, no. 1, pp. 32-7, 2018.

[55] P. D. Lister, D. J. Wolter, and N. D. Hanson, "Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms," *Clin Microbiol Rev,* vol. 22, no. 4, pp. 582-610, Oct 2009.

[56] G. Y. Liu *et al.*, "Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity," (in English), J Exp Med, vol. 202, no. 2, pp. 209-215, Jul 18 2005.

[57] A. Ogston, "Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases," (in eng), *Br Med J,* vol. 1, no. 1054, pp. 369 b2-375, Mar 12 1881.

[58] J. Kluytmans, A. van Belkum, and H. Verbrugh, "Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks," *Clin Microbiol Rev,* vol. 10, no. 3, pp. 505-20, Jul 1997.

[59] H. F. Wertheim *et al.*, "The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections," *Lancet Infect Dis,* vol. 5, no. 12, pp. 751-62, Dec 2005.

[60] R. J. Gordon and F. D. Lowy, "Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection," *Clin Infect Dis,* vol. 46 Suppl 5, no. Supplement_5, pp. S350-9, Jun 1 2008.

[61] L. Debarbieux, "[Experimental phage therapy in the beginning of the 21st century]," *Med Mal Infect,* vol. 38, no. 8, pp. 421-5, Aug 2008. La phagotherapie experimentale a l'aube du XXIe siecle.

[62] J. B. Lyczak, C. L. Cannon, and G. B. Pier, "Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist1*Address for correspondence: Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA," *Microbes and Infection,* vol. 2, no. 9, pp. 1051-1060, 2000/07/01/ 2000.

[63] J. Bisbe *et al.*, "Pseudomonas aeruginosa bacteremia: univariate and multivariate analyses of factors influencing the prognosis in 133 episodes," *Rev Infect Dis,* vol. 10, no. 3, pp. 629-35, May-Jun 1988.

[64] S. T. Micek, A. E. Lloyd, D. J. Ritchie, R. M. Reichley, V. J. Fraser, and M. H. Kollef, "Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment," *Antimicrob Agents Chemother,* vol. 49, no. 4, pp. 1306-11, Apr 2005.

[65] G. Cabot *et al.*, "Evolution of Pseudomonas aeruginosa Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates," *Antimicrob Agents Chemother,* vol. 60, no. 3, pp. 1767-78, Jan 4 2016.

[66] C. Friedlaender, "Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie," *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin,* vol. 87, no. 2, pp. 319-324, 1882/02/01 1882.

[67] S. T. Bagley, "Habitat association of Klebsiella species," *Infect Control,* vol. 6, no. 2, pp. 52-8, Feb 1985.

[68] C. Rock, K. A. Thom, M. Masnick, J. K. Johnson, A. D. Harris, and D. J. Morgan, "Frequency of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing Klebsiella species contamination of healthcare workers and the environment," *Infect Control Hosp Epidemiol,* vol. 35, no. 4, pp. 426-9, Apr 2014.

[69] M. K. Paczosa and J. Mecsas, "Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense," *Microbiol Mol Biol Rev,* vol. 80, no. 3, pp. 629-61, Sep 2016.

[70] R. Podschun and U. Ullmann, "Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors," (in eng), *Clin Microbiol Rev,* vol. 11, no. 4, pp. 589-603, Oct 1998.

[71] L. Diancourt, V. Passet, J. Verhoef, P. A. Grimont, and S. Brisse, "Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates," *J Clin Microbiol,* vol. 43, no. 8, pp. 4178-82, Aug 2005.

[72] F. d'Herelle, "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques,", Acta Kravsi, vol. 165, pp. 373-375, 1917.

[73] F. W. Twort, "An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses," *The Lancet,* vol. 186, no. 4814, pp. 1241-1243, 1915/12/04/ 1915.

[74] F. B. d'Herelle, "Sur le microbe bactériophage," vol. 82, p. 1237, 1919.

[75] Z. Elmouatassim, "Phagothérapie: Des virus pour combattre les infections," 2017.

[76] F. Ravat, P. Jault, and J. Gabard, "[Not Available]," *Ann Burns Fire Disasters,* vol. 28, no. 1, pp. 13-20, Mar 31 2015. Bacteriophages et phagotherapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bacteriennes.

[77] A. Dublanchet, "Qu'est-ce que la phagothérapie ?," *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale,* no. 4, 2014.

[78] H. W. Ackermann and D. Prangishvili, "Prokaryote viruses studied by electron microscopy," *Arch Virol,* vol. 157, no. 10, pp. 1843-9, Oct 2012.

[79] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, and H. Fessi, "Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations," *Adv Drug Deliv Rev,* vol. 58, no. 15, pp. 1688-713, Dec 30 2006.

[80] J. Liesebach, T. Rades, and M. Lim, "A new method for the determination of the unfrozen matrix concentration and the maximal freeze-concentration," (in English), *Thermochimica Acta,* vol. 401, no. 2, pp. 159-168, May 19 2003.

[81] X. Tang and M. J. Pikal, "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice," *Pharm Res,* vol. 21, no. 2, pp. 191-200, Feb 2004.

[82] M. J. Pikal, S. Shah, M. L. Roy, and R. Putman, "The Secondary Drying Stage of Freeze-Drying - Drying Kinetics as a Function of Temperature and Chamber Pressure," (in English), Int J Pharmaceut, vol. 60, no. 3, pp. 203-217, May 21 1990.

[83] E. Bogdani, "Freeze-drying of ibuprofen by using organic solvent," Université Claude Bernard - Lyon I, 2011LYO10225, 2011.

[84] P. Matejtschuk, "Lyophilization of Proteins," in *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, J. G. Day and G. N. Stacey, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, pp. 59-72.

[85] J. C. M. Louis Rey, Freeze-Drying/Lyophilization Of Pharmaceutical & Biological Products, Revised and Expanded, 2004, p. 600 pages. [Online]. Available.

[86] M. J. Pikal, "Use of Laboratory Data in Freeze Drying Process Design: Heat and Mass Transfer Coefficients and the Computer Simulation of Freeze Drying," vol. 39, no. 3, pp. 115-139, May 1, 1985 %J PDA PDA J Pharm Sci Technol 1985.

[87] T. J. Anchordoquy, K. I. Izutsu, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter, "Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying," *Arch Biochem Biophys,* vol. 390, no. 1, pp. 35-41, Jun 1 2001.

[88] J. D. Meyer, R. Nayar, and M. C. Manning, "Impact of bulking agents on the stability of a lyophilized monoclonal antibody," *Eur J Pharm Sci,* vol. 38, no. 1, pp. 29-38, Aug 12 2009.

[89] S. S. Y. Leung *et al.*, "Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders," *Int J Pharm,* vol. 521, no. 1-2, pp. 141-149, Apr 15 2017.

[90] Y. Tian, J. C. Visser, J. S. Klever, H. J. Woerdenbag, H. W. Frijlink, and W. L. J. Hinrichs, "Orodispersible films based on blends of trehalose and pullulan for protein delivery," *Eur J Pharm Biopharm,* vol. 133, pp. 104-111, Dec 2018.

[91] T. Rose *et al.*, "Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps," (in eng), *Int J Burns Trauma,* vol. 4, no. 2, pp. 66-73, 2014.

[92] D. Patel, S. A. Chaudhary, B. Parmar, and N. J. T. P. I. Bhura, "Transdermal drug delivery system: a review," vol. 1, no. 4, Int J Pharm Sci Res, 2012.

[93] V. Rastogi, P. Yadav, A. Verma, and J. K. Pandit, "Ex vivo and in vivo evaluation of microemulsion based transdermal delivery of E. coli specific T4 bacteriophage: A rationale approach to treat bacterial infection," *Eur J Pharm Sci,* vol. 107, pp. 168-182, Sep 30 2017.

[94] R. Katsarava, D. Tugushi, V. Beridze, and N. Tawil, "Composition comprising a polymer and a bioactive agent and method of preparing thereof," ed: Google Patents, 2016.

[95] D. Guglielmotti, D. Mercanti, J. Reinheimer, and A. D. L. Quiberoni, "Review: Efficiency of Physical and Chemical Treatments on the Inactivation of Dairy Bacteriophages," (in English), Review vol. 2, no. 282, Front Microbiol, 2012-January-11 2012.

[96] D. K. Eggers and J. S. Valentine, "Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins," *J Mol Biol,* vol. 314, no. 4, pp. 911-22, Dec 7 2001.

[97] R. C. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.

[98] I. Bakaltcheva, A. M. O'Sullivan, P. Hmel, and H. Ogbu, "Freeze-dried whole plasma: Evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers," (in English), *Thrombosis Research,* vol. 120, no. 1, pp. 105-116, 2007.

[99] B. S. Kendrick *et al.*, "Preferential exclusion of sucrose from recombinant interleukin-1 receptor antagonist: role in restricted conformational mobility and compaction of native state," *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 94, no. 22, pp. 11917-22, Oct 28 1997.

[100] P. Manohar and N. Ramesh, "Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages," Sci Rep*,* vol. 9, no. 1, p. 15242, 2019/10/23 2019.

[101] M. A. Mensink *et al.*, "In-line near infrared spectroscopy during freeze-drying as a tool to measure efficiency of hydrogen bond formation between protein and sugar, predictive of protein storage stability," (in English), Int J Pharm*,* vol. 496, no. 2, pp. 792-800, Dec 30 2015.

[102] P. Jault *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,* vol. 19, no. 1, pp. 35-45, 2019/01/01/ 2019.

[103] C. D. Jepson and J. B. March, "Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle," (in English), *Vaccine,* vol. 22, no. 19, pp. 2413-2419, Jun 23 2004.

[104] K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, and K. M. Shakesheff, "Polymeric systems for controlled drug release," *Chem Rev,* vol. 99, no. 11, pp. 3181-98, Nov 10 1999.

[105] R. K. Moawad, M. M. S. Ashour, G. F. Mohamed, and E. M. A. El-Hamzy, "Effect of food grade trisodium phosphate or water dip treatments on some quality attributes of decapitated white marine shrimp (Penaeus spp.) during frozen storage," (in English), J Appl Sci Res vol. 9, no. 6, pp. 3723-3734, 2013.