

Les thérapeutiques anti-infectieuses non antibiotiques

Antiinfective therapies other than antibiotics

É. Kipnis · R. Dessein · K. Faure · B. Guery

Reçu le 10 janvier 2012 ; accepté le 29 février 2012
© SRLF et Springer-Verlag France 2012

Résumé Dans un contexte où la résistance aux antibiotiques est un phénomène de plus en plus préoccupant, une analyse systématique des autres options thérapeutiques semble fondamentale en pathologie infectieuse. Les anticorps poly-puis monoclonaux représentent une piste thérapeutique majeure avec le développement d'anticorps dirigés contre les systèmes de virulence spécifiques de certains pathogènes. La modulation du *quorum-sensing* et des facteurs de virulence en dépendant est une approche en plein développement en pathologie aiguë comme dans les infections chroniques. Enfin, les bactériophages ou les probiotiques peuvent aussi constituer une solution de recours dans divers tableaux infectieux. Cette revue précise les avancées dans chacun de ces domaines de la thérapeutique anti-infectieuse non antibiotique.

Mots clés Antibiotiques · Résistance · Anticorps · Probiotiques

Abstract Given the preoccupying increase of antimicrobial resistance, a systematic review of alternative therapeutic options seems necessary for anyone involved in managing infectious diseases. Both polyconal and monoclonal antibodies represent a major alternative to conventional antimicrobials, especially when considering the development of monoclonal antibodies against specific bacterial virulence factors.

É. Kipnis
Service de réanimation chirurgicale, hôpital Huriez,
CHRU Lille

R. Dessein
Laboratoire de bactériologie hygiène,
centre de biologie-pathologie, CHRU Lille

K. Faure · B. Guery (✉)
Service de maladies infectieuses, hôpital Huriez, CHRU Lille
e-mail : bguery@in vivo.edu

B. Guery
SGRIVI, hôpital Calmette, pavillon Christiaens,
1, boulevard du Professeur Leclercq, F-59037 Lille cedex

Modulating the expression of virulence factors by interfering with quorum-sensing systems is another major emerging approach to both acute and chronic infections. Finally, phage therapy and probiotics may also be considered as additional alternatives or adjuncts to antimicrobial therapy. This review presents a brief overview of the recent advances in the fields of non-antibiotic antimicrobial therapy.

Keywords Antibiotics · Resistance · Antibodies · Probiotics

Introduction

Au début du xx^e siècle, les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des pathologies infectieuses avec une amélioration majeure de la mortalité. Les progrès de la recherche ont permis, jusque dans les années 1990, un développement incessant de nouvelles molécules de mécanismes d'action variés et complémentaires, permettant de répondre de façon adaptée à l'évolution de la résistance. Les années 2000 ont été marquées par une perte de cette sensation d'invulnérabilité stigmatisée par l'apparition de bactéries d'abord multi-résistantes puis pan-résistantes à l'origine d'authentiques impasses thérapeutiques. Ce nouveau challenge a donc motivé ces dernières années un regain d'intérêt pour des thérapeutiques considérées comme alternatives. Cette revue est centrée sur ces approches novatrices dont certaines existent déjà depuis plusieurs dizaines d'années comme les bactériophages, d'autres sont issues d'une recherche fondamentale et d'une meilleure connaissance de la relation hôte/pathogène comme les anticorps, la modulation des systèmes de virulence ou les probiotiques.

Les anticorps

La sérothérapie et immunisation passive

La sérothérapie consiste à traiter des pathologies infectieuses en utilisant des sérums d'origine animale ou humaine riches

en anticorps spécifiques capables de neutraliser de manière transitoire, une toxine bactérienne, un venin ou un virus. C'est Behring et Kitasato qui avaient rapporté pour la première fois que le transfert d'anticorps du sang d'animaux infectés conférait une immunité contre la diphtérie. La sérothérapie a alors été utilisée dans de nombreuses pathologies infectieuses telles que la pneumonie à pneumocoque, la méningite à méningocoque ou l'érysipèle [1]. La sérothérapie posait un certain nombre de problèmes comme les complications d'hypersensibilité immédiate et la maladie sérique [1]. Elle fut rapidement supplantée dans l'entre-deux guerres par les antibiotiques de fabrication industrielle facile, de toxicité moindre et d'efficacité plus prévisible et persistante. Surtout, à l'inverse de ces sérums produits par une immunisation envers un pathogène précis, les antibiotiques pouvaient être administrés sans diagnostic microbiologique précis du fait de leur large spectre. La sérothérapie a néanmoins perduré dans des indications restreintes de prophylaxie/traitement post-exposition de virus (rage, hépatites A et B, varicelle, cytomégalovirus...) ou de toxines sans alternatives thérapeutiques (diphtérie, tétanos, botulisme).

De la sérothérapie découle l'immunisation passive qui consiste à injecter directement au patient des anticorps dirigés contre l'agent pathogène ou un de ses facteurs de virulence comme les toxines, et non le sérum en entier. Les deux types d'anticorps utilisés sont les immunoglobulines humaines polyclonales poolées (IVIG) qui reconnaissent plusieurs cibles microbiennes ou épitopes, et les anticorps monoclonaux (mAb) qui reconnaissent un seul épitope. À la différence de l'immunisation active (ou vaccination conventionnelle), où il faut attendre le développement de la réponse anticorps, cette forme d'immunisation protège immédiatement le patient. Néanmoins, l'effet ne dure que quelques mois du fait d'une absence de stimulation suffisante du système immunitaire comme l'auraient fait les antigènes d'un microorganisme pathogène d'un vaccin classique. Ainsi, l'immunisation passive peut être utilisée à visée prophylactique ou thérapeutique, par administration d'anticorps isolés à partir de sujets ou d'animaux préalablement immunisés. L'immunisation passive s'est considérablement développée dans les domaines de l'oncologie et de la rhumatologie, avec la commercialisation de nombreux anticorps monoclonaux, alors que paradoxalement, elle tarde à prendre son essor dans le domaine de l'infectiologie qui l'a vue naître.

Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits par un clone unique de lymphocytes B. Ils ne reconnaissent qu'un seul type de site antigénique, contrairement aux anticorps polyclonaux. Les premiers anticorps monoclonaux étaient entièrement d'origine animale. Ils ont été produits par la technique des hybridomes qui consiste à former des

hybrides entre les lymphocytes B d'animaux immunisés avec un antigène donné et des cellules myélomateuses d'origine animale. Leur utilisation à des fins thérapeutiques s'est trouvée limitée par la part animale de l'anticorps responsable d'une immunogénicité à l'origine d'une perte d'efficacité de ces anticorps. D'où le développement, avec l'évolution des technologies de biologie moléculaire, d'anticorps chimériques humain-animal (suffixe « -ximab ») puis des anticorps dit « humanisés » (suffixe « -zumab »). Les premiers ne comportent que la partie variable d'origine animale (qui porte la spécificité contre l'antigène cible) et la partie constante est d'origine humaine. Cependant, ces chimères comportent encore une partie importante de protéines d'origine animale potentiellement immunogènes. Pour réduire la part animale, ont été développés des anticorps humanisés. Ils contiennent la plus petite partie possible d'origine animale à l'origine de la reconnaissance de l'antigène cible. Même s'ils induisent beaucoup moins de réponses immunes que les précédents, l'affinité de l'anticorps humanisé n'est pas toujours aussi élevée que l'anticorps d'origine. C'est pourquoi une dernière approche consiste en la synthèse unique du fragment (*fragment antigen-binding*, Fab) qui reconnaît l'antigène (*small chain fragment variant*, ScFv). Enfin, les anticorps monoclonaux peuvent également être obtenus chez des souris transgéniques porteuses de gènes humains codant pour des immunoglobulines ou par méthodes d'expression génique dans des microorganismes [2].

Modes d'action

Les anticorps agissent par des mécanismes antimicrobiens directs : neutralisation de toxines, interférence avec le pathogène et effet bactéricide [3], et indirects via le fragment immunomodulateur (fragment cristallisable, Fc), tels que l'opsonisation et l'activation de la réponse innée, notamment du complément [4].

Avantages et inconvénients

Alors que l'administration systémique d'antibiotiques altère le microbiome favorisant l'émergence de résistances [5], les diarrhées post-antibiotiques [6] et les phénomènes atopiques [7], les anticorps monoclonaux, qui ne ciblent qu'un pathogène, sont dénués de ces effets délétères. Mais cette spécificité constitue également leur plus grande limite en tant qu'anti-infectieux : l'impossibilité d'y recourir sans un diagnostic spécifique du pathogène infectant. Cette spécificité extrême entraîne également un risque théorique d'échappement par une mutation touchant l'épitope ciblé. D'autre part, leur effet n'est pas aussi prévisible qu'un composé chimique : une quantité trop faible peut ne produire aucun effet et une quantité trop importante peut entraîner des effets modulateurs de la réponse de l'hôte, soit délétères

(effet *prozone-like* [8], soit bénéfiques, liés à l'atténuation de réponses délétères et l'activation de réponses antimicrobiennes via le fragment Fc [4]. Enfin, le coût des immunothérapies reste très élevé comparé aux antibiotiques, du fait des technologies en jeu, de leur fragilité et conservation difficile. De ce fait, ces thérapeutiques ne pourront se développer que là où les antibiotiques font déjà défaut (contre certains virus ou toxines), en cas de germes multirésistants, ou en tant qu'adjuvants en association avec les antibiotiques [9].

Cibles

Un panorama de pathogènes ciblés par des anticorps monoclonaux et apparentés est présenté dans un tableau dont certains sont discutés ci-après (Tableau 1).

Toxines bactériennes

Les pathologies dues aux toxines représentent des cibles traditionnelles du fait de l'efficacité de leur neutralisation et des enjeux liés au bioterrorisme [10]. *Bacillus anthracis*, responsable du charbon bactérien (anthrax) est exemplaire car le vaccin n'est pas utilisable en post-exposition et des souches résistantes aux antibiotiques émergentes [11]. Plusieurs anticorps monoclonaux en développement ciblent actuellement l'antigène protecteur (PA) du système à trois toxines : le raxibacumab (ABthrax), l'anthim, en cours de phase I/II, et le valotrim [12]. Une autre approche consiste à mettre au point des anticorps monoclonaux capables d'interagir avec deux des trois toxines à la fois, PA et le facteur œdémogène (EF) [13].

Le syndrome hémolytique urémique (SHU) dû à la Shiga-like toxine IIB des *Escherichia coli* (STEC) sont un second exemple [14]. Plusieurs anticorps monoclonaux ont été développés et testés en étude de phases I et II [15,16], d'autres immunothérapies visant la réponse de l'hôte via le complément semblent également avoir une efficacité, celles-ci ont été testées lors de l'épidémie récente de SHU liée au STEC en Europe [17].

Du fait d'une pathogénicité essentiellement liée aux toxines A et B, les infections à *Clostridium difficile* sont également ciblées. Une étude de phase III multicentrique de l'utilisation de deux antitoxines A et B (CDA1 et CDB1) contre placebo en adjuvant au traitement antibiotique a montré une diminution des récurrences (8 % dans le groupe anticorps contre 32 % pour le groupe placebo, $p=0,06$) [18].

Facteurs de virulence spécifiques

D'autres immunothérapies monoclonales ciblent les facteurs de virulence de bactéries qui sont exprimés par la majorité des souches.

- *Staphylococcus* spp.

Le pagibaximab, spécifique de l'acide lipotéchoïque a montré une efficacité contre les staphylocoques coagulase négatifs et *S. aureus* [19]. Une étude phase II du pagibaximab chez les nouveau-nés à risque a montré son innocuité et l'absence d'infections staphylococciques au cours de l'étude [20]. Le tefibazumab (Aurexis[®]) est un anticorps monoclonal anti-clumping factor A (ClfA), récepteur du fibrinogène [21] qui a échoué en phase II [22] et dont le développement a été abandonné. Deux essais de phase II d'altastaph, un anticorps polyclonal dérivé de sérums de patients traités par un vaccin actif (le StaphVax[®]) ont échoué dans les bactériémies [23,24] et leur développement a aussi été abandonné. D'autres pistes précliniques sont des anticorps monoclonaux ciblant l'alpha-hémolysine (H1a) staphylococcique dans la prévention des lésions de pneumonie [25] ou ciblant les superantigènes responsables du syndrome de choc toxique staphylococcique [26].

- Fongique : *Candida* spp. et *Cryptococcus* spp.

Un anticorps monoclonal a été mis au point et testé en phase I pour le traitement de la méningite cryptococcique avec une efficacité sur la diminution sérique de l'antigénémie mais uniquement à des doses peu compatibles avec un développement thérapeutique [27]. Un anticorps anti-heat shock protein 90 (Hsp90), l'enfungumab [28], a de même été développé devant l'existence d'une corrélation entre la réponse humorale dirigée contre la Hsp90 fongique (Hsp90) et un pronostic favorable au cours des candidoses invasives [29].

Cibles innovantes

- Cibles transversales : systèmes de virulence conservés ?

Certains anticorps monoclonaux pourraient cibler des antigènes conservés au sein de systèmes de virulence communs à plusieurs pathogènes tels que le *quorum-sensing* (QS) [30] à l'instar des anticorps monoclonaux bloquant les auto-inducteurs du système QS Agr du staphylocoque [31].

Sur le même principe, les systèmes de sécrétion de type 3 (SST3), capables « d'injecter » des toxines dans les cellules eucaryotes, sont présents chez plusieurs pathogènes dont *Pseudomonas aeruginosa*.

L'utilisation d'une approche vaccinale dans les infections sévères est proposée depuis maintenant plusieurs années avec des essais réalisés sur des pathologies induites par plusieurs type de germes Gram-positif ou négatif. L'une des approches les plus convaincantes a été réalisée à partir d'une recherche centrée sur *P. aeruginosa*. Il s'agit d'une bactérie Gram-négatif capable d'induire un grand nombre de pathologies essentiellement dans un contexte nosocomial. Les

Tableau 1 Les différentes immunothérapies anti-infectieuses à base d'anticorps en cours d'investigation					
Pathogène/Cible(s)	Structure	Immunothérapie	Entreprise(s)	Phase	N° Clinical Trials
<i>Bacillus anthracis</i>					
Protective Antigen (PA)	mAb humain	Raxibacumab (Abthrax [®])	Human Genome Sciences / AstraZeneca	Phase I	ND
	mAb humain	MDX-1303 (Valortim [®])		Phase III	NCT00639678
(PA) + Edema Factor (EF)	mAb bispécifique	ETI-204 (Anthim [®])	Elusys Therapeutics	Phase I	NCT00964834
				Phase I	NCT01204866
				Phase I	NCT01265745
				Phase I	NCT01453907
				Phase I	NCT00829582
<i>Bordetella pertussis</i>					
Toxine pertussique	mAb humain	P-IGIV	Emergent BioSolutions	Phase III	ND
	mAb humain	AVP-21D9		Phase I	NCT01202695
<i>Staphylococcus spp.</i>					
Pompe à efflux ABC	Fragment mAb (scFv)	Aurograb [®]	NeuTec Pharma /Novartis	Phase III	NCT00217841
Acide lipotéichoïque	mAb chimérique humain	BSYX-A110 (Pagibaximab [®])	Biosynexus, Inc.	Phase I	NCT00636285
				Phase I/II	NCT00631878
				Phase II/III	NCT00646399
				Phase II	NCT00631800
<i>Clumping factor A</i> (ClfA)	Fragment mAb humanisé	Tefibazumab (Aurexis [®])	Inhibitex	Phase II	NCT00198302
				Phase II	NCT00198289
MSCRAMM	Sérum polyclonal	Veronate [®]	Inhibitex	Phase III	NCT00113191
Polysaccharides capsulaires	Sérum de sujets vaccinés (Staphvax [®])	Altastaph [®]	Nabi Biopharmaceuticals	Phase I/II	NCT00063089
				Phase II	NCT00066989
Toxine Alpha1	mAb murin, Ig polyclonal			Pré-clinique	
Leucocidine de Panton Valentine	mAb murin			Pré-clinique	
Staphylococcus Enterotoxin B	mAb murin			Pré-clinique	
Protéine A	mAb bispécifique (+CR-1)	ETI-211	Elusys Therapeutics	Pré-clinique	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
O-polysaccharides du LPS	mAb humain	KBPA 101 (Aerumab11 [®])	Kenta Biotech	Phase II	NCT00851435
Antigène PcrV du T3SS	fragment Fab-PEGylé de mAb	KB-001	KaloBios Pharmaceuticals	Phase I/II	NCT00691587
				Phase I/II	NCT00638365
<i>Clostridium difficile</i>					
Toxine A	mAb humain	GS-CDA1	Medarex / MBL Pharma	Phase II	NCT00350298
Toxine B	mAb humain	MDX-1388	Medarex / MBL Pharma	Phase II	NCT00350298

(Suite page suivante)

Tableau 1 (suite)					
Pathogène/Cible(s)	Structure	Immunothérapie	Entreprise(s)	Phase	N° Clinical Trials
Toxine A	mAb humain	MK-3415	Merck	Phase III	NCT01241552
Toxine A	mAb humain	MK-6072	Merck	Phase III	NCT01241552
Toxine A+B	mAb humain	MK-3415A	Merck	Phase III	NCT01241552
<i>Escherichia Coli</i> producteurs de Shiga-like Toxines (STEC)					
Shiga-like Toxin 1	mAb	αStx1 (Shigamab [®])	Thallion / LFB Biotechnologies	Phase II	NCT01252199
Shiga-like Toxin 2	mAb	αStx2 (Shigamab [®])	Thallion / LFB Biotechnologies	Phase II	NCT01252199
Shiga-like Toxin 2	mAb humanisé	urtoxazumab	Teijin America	Phase I	ND
<i>Candida spp.</i>					
Hsp90 fongique	Fragments d'anticorps (scFv)	efungumab (Mycograb [®])	NeuTec Pharma / Novartis	Phase III	ND
<i>Cryptococcus neoformans</i>					
Hsp90 fongique	Fragments d'anticorps (scFv)	efungumab (Mycograb [®])	NeuTec Pharma Ltd/ Novartis	Phase II Phase II	NCT00847678 NCT00324025

CR-1 : récepteur du complément 1 ; Hsp90 : *heat shock protein* ; LPS : lipopolysaccharide ; mAb : anticorps monoclonal ; MSCRAMM : *microbial surface components recognizing adhesion matrix molecules* ; ND : non disponible ; scFv : *small chain fragment variant* ; SST3 : système de sécrétion type 3

sphères urinaires et respiratoires sont les principales cibles rencontrées. En pathologie respiratoire, *P. aeruginosa* est associé aux pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) avec une morbi-mortalité élevée [32]. *P. aeruginosa* est un pathogène complexe qui dispose d'un grand nombre de facteurs de virulence [33] ; parmi ceux-ci, le système de sécrétion de type III (SST3) tient une place particulière [34-36]. D'un point de vue expérimental, Sawa et al. ont montré, sur un modèle murin, le rôle majeur de PcrV dans la mortalité liée à ce pathogène [37]. PcrV fait partie du translocon qui permet la sécrétion des quatre exotoxines de *P. aeruginosa* : Exo U, S, T, et Y. Dans ce travail, la vaccination dirigée contre PcrV permettait une survie des animaux infectés avec une diminution de l'inflammation et de la lésion pulmonaire induite. Ces résultats ont été retrouvés dans d'autres modèles [38]. Le rôle majeur du système de sécrétion de ce type dans le choc septique induit par *P. aeruginosa* fut démontré par la même équipe [39], ces auteurs ayant montré l'importance de la décompartmentalisation de la réponse inflammatoire induite par la production des toxines du SST3. Ces données furent confirmées dans des travaux d'autres équipes [40,41]. De façon concomitante à ces travaux expérimentaux, des données cliniques ont permis de retrouver ce rôle prépondérant du SST3 chez l'homme. Un travail princeps de Roy-Burman et al., réalisé à partir de prélèvements de 108 patients, a montré un risque relatif de mortalité multiplié par six en cas d'expression d'Exo S, T, U ou de PcrV [42]. Hauser et al., sur un collectif

de 35 patients de réanimation atteints de pneumonie à *P. aeruginosa* ont montré que la présence du SST3 était associé à un moins bon pronostic clinique [43]. La présence d'Exo U semble par ailleurs être un marqueur de virulence particulier à la fois dans le modèle expérimental et en clinique [44,45]. L'ensemble de ces données a donc suscité une recherche centrée sur la production d'anticorps dirigés contre le SST3. Un premier travail a montré, dans deux modèles animaux d'agression pulmonaire par *P. aeruginosa*, le rôle protecteur d'anticorps polyclonaux dirigés contre PcrV [46]. Le modèle réalisé chez le lapin montrait une diminution de la lésion pulmonaire, de la bactériémie, des taux de *tumor necrosis factor* (TNF) et une amélioration des paramètres hémodynamiques. L'utilisation du fragment Fab permettait par ailleurs d'obtenir une protection identique. Un anticorps monoclonal dirigé contre PcrV fut ensuite développé, et de la même manière, le fragment Fab induisait une protection comparable dans un modèle murin létal [47,48]. Un fragment Fab humanisé, se liant au PcrV de *P. aeruginosa* avec une haute affinité, fut ensuite mis au point [49]. L'administration d'une dose unique de cet anticorps permettait chez la souris une protection complète contre un inoculum létal à *P. aeruginosa*. Des protocoles de phase 2 sont actuellement en cours dans la prévention des pneumonies à *P. aeruginosa* chez le patient de réanimation colonisé [50] et dans le cadre de la mucoviscidose. D'autres approches vaccinales sont actuellement développées dans l'infection liée à *P. aeruginosa*, un anticorps

monoclonal conjugué, KBPA-101 a montré une bonne tolérance chez le volontaire sain [51].

- Cibles transversales d'espèce ?

L'enfungumab (Mycograb[®]) cité ci-dessus est dirigé contre l'Hsp90 fongique, conservé dans de nombreuses espèces fongiques, et a montré une efficacité contre *Candida* in vivo [28] mais aussi *Cryptococcus neoformans* [52], surtout en synergie avec des antifongiques comme la caspofungine et l'amphotéricine B. Une étude en phase III en association avec l'amphotéricine B dans le traitement des candidoses invasives a montré une diminution de la mortalité attribuable de 18 % à 4 % en associant l'enfungumab versus l'amphotéricine seule [53].

- Association avec les antibiotiques

Cette utilisation en association en tant qu'adjuvant potentialisateur illustre la place que pourrait prendre les immunothérapies spécifiques dans le traitement des infections. De même, des études récentes ont montré l'utilité in vivo d'associer anticorps anti-PcrV du SST3 et antibiotiques contre *P. aeruginosa* [54], et l'utilité in vitro d'une association entre un anticorps anti-pompe à efflux ABC et les antibiotiques contre *S. maltophilia* [55].

- Activation ciblée de la réponse de l'hôte

Une approche innovante consiste à faire le lien entre l'activité antimicrobienne spécifique et l'activation de réponses de l'hôte par un anticorps bispécifique dont un bras reconnaît l'antigène microbien et l'autre active un récepteur de l'immunité innée, notamment du complément. Ainsi ont été mis au point des anticorps bispécifiques récepteur CR1 du complément et *P. aeruginosa* [56], *B. anthracis* [57] et *S. aureus* [58].

- Ciblage d'épitopes multiples

Pour pallier l'hyperspécificité des anticorps monoclonaux, la mise au point d'anticorps bispécifiques a été proposée contre : *P. aeruginosa* [59], le facteur létal et le facteur œdématogène de *B. anthracis* [13]. Au-delà de la bispécificité, l'utilisation de multiples anticorps monoclonaux reste une possibilité testée contre la toxine botulinique [60].

- Radioimmunothérapie

Une preuve de concept expérimental de radio-immunothérapie anti-infectieuse a été établie dans l'infection par *C. neoformans* [61], *Histoplasma capsulatum* [62] et *S. pneumoniae* [63].

Perspectives d'utilisation

À une époque où l'antibiothérapie précoce et donc probabiliste est la règle, l'absence de diagnostic précoce spécifique du germe responsable est le principal obstacle non financier à l'utilisation thérapeutique des immunothérapies. Avec le développement récent de multiples technologies de diagnostic rapide telles que la *polymerase chain reaction* (PCR), la reverse transcriptase (rt)-PCR et la spectrométrie de masse, les perspectives d'utilisation d'anticorps ciblant le pathogène rapidement identifié deviendront réalistes. Une autre utilisation à échéance plus proche serait prophylactique chez des patients colonisés par des germes déjà identifiés et à haut risque de développer des complications en rapport, telles que pneumonies acquises sous ventilation chez les patients dont les voies respiratoires sont colonisées par *P. aeruginosa* ou porteurs de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) en colonisation nasale.

L'inhibition du QS

Le QS (littéralement la détection du nombre minimum d'individus nécessaires à l'activité du groupe) désigne le principe commun de communication intercellulaire entre microorganismes qui leur permet de détecter leur densité et de coordonner leur expression génique notamment en matière de virulence et de formation de biofilms. Le QS fonctionne par la synthèse et la sécrétion de molécules de signalisation intercellulaire, appelées des « auto-inducteurs », qui diffusent librement et dont la concentration intracellulaire reflète la concentration extracellulaire et donc la densité des microorganismes environnants. Ces signaux sont détectés par des interactions moléculaires spécifiques qui entraînent activation et inactivation de gènes. Les auto-inducteurs recouvrent plusieurs classes de composés : les oligopeptides des bactéries Gram-positifs tels les *autoinducing peptides* (AIPs) de *S. aureus*, les dérivés du dihydroxypentanedione (DPD) tels AI-2 de *V. harveyi* retrouvé chez les Gram-positifs et Gram-négatifs, les N-acyl homoserine lactones (AHLs) des Gram-négatifs, et diverses petites molécules telles que le *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) [64].

Chez *S. aureus*, le QS peptidique dépend du gène régulateur *agr* qui code pour un peptide (AIP) qui régule plus de 70 gènes via deux promoteurs P2 et P3 produisant deux mRNA (RNAII et RNAIII) avec une implication directe dans l'adhésion ou l'invasion. Une inhibition spécifique de ce système est en cours de recherche via un peptide inhibiteur du RNAIII (RIP) qui semble prometteur dans des modèles animaux et sur biofilms [65].

Trois systèmes majeurs constituent le QS chez *P. aeruginosa* : les systèmes *las* et *rhl*, et le *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *las* et *rhl* fonctionnent via la production

d'acyl-homosérine lactones (AHLs), auto-inducteurs qui agissent sur des promoteurs distincts impliqués dans la régulation de l'expression de multiples facteurs de virulence dont l'élastase, la protéase alcaline, l'exotoxine A, les rhamnolipides, la pyocyanine, les lectines et la formation du biofilm. Le PQS est un troisième auto-inducteur qui régule la formation du biofilm et l'expression de l'élastase, la pyocyanine et de la lectine LecA. La relevance de ces systèmes *QS* de *P. aeruginosa* dans des souches cliniques a été démontrée [66]. Du fait de l'importance du *QS* dans la virulence de *P. aeruginosa*, de nombreuses voies d'inhibition sont en cours de recherche et ont montré un intérêt en préclinique : inhibiteurs naturels (composés cycliques sulfurés, les furanones halogénées, l'extrait d'ail, des extraits de plantes telles que la catéchine), inhibiteurs de synthèse et concentrations sub-inhibitrices de macrolides.

Le *QS* d'*E. coli*, plus complexe, implique les gènes *qseC* et *luxS*, et la production d'auto-inducteur AI-3 agissant sur l'îlot de pathogénicité, *locus of enterocyte effacement* (LEE). Cet îlot régule l'expression de plus de 400 gènes dont le système de sécrétion type 3, la motilité flagellée, les gènes d'adhésion et la production de Shiga toxines. La découverte d'AI-3 a généré une quête d'inhibiteurs spécifiques dont un récemment identifié : le N-phenyl-4 [(phenylamino)thioxomethyl]amino}-benzenesulfonamide (LED209).

Outre les exemples de systèmes de *QS* et de voies de recherche d'inhibiteurs spécifiques cités ci-dessus, l'inhibition du *QS* est un domaine de recherche préclinique en plein développement avec de multiples possibilités [67] dont : les inhibiteurs naturels produits par les formes de vie marine (dont les furanones) ou les plantes (dont les flavonoïdes [68], l'hamamelitannine et l'extrait d'ail). Certains enzymes dégradent les auto-inducteurs que peuvent produire les cellules eucaryotes pour se défendre contre les pathogènes avec des effets contre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis*, ou encore *S. aureus* [31].

Sur le plan des études cliniques, une étude de phase II évaluant l'azithromycine dans la modulation du *QS* dans la prévention des pneumonies acquises sous ventilation à *P. aeruginosa* (NCT00610623) a été interrompue pour des raisons de financement. Une étude de phase I de l'effet de différents probiotiques et de l'azithromycine sur le passage systémique d'auto-inducteurs du *QS* vient de se terminer (NCT01201577). Une étude observationnelle des niveaux d'AHLs du *QS* de *P. aeruginosa* dans les crachats de patients atteints de poussées de mucoviscidose est en cours (NCT01306279). Enfin, une étude pilote d'extrait d'ail chez les patients atteints de mucoviscidose a montré une bonne tolérance et une tendance à l'amélioration [69].

L'inhibition du *QS* n'est pas bactériostatique ou bactéricide mais vise à atténuer la virulence. De ce fait, cette voie thérapeutique n'est concevable qu'en tant qu'adjuvant à une thérapeutique antimicrobienne vraie, telle qu'en association

avec des antibiotiques. Toutefois, en limitant la formation de biofilm, ces thérapeutiques pourraient diminuer l'émergence de résistance aux antibiotiques utilisés et permettre l'utilisation d'antibiotiques à des doses plus faibles ou restaurer la sensibilité à certains antibiotiques. En attendant plus d'études cliniques de ces composés, il s'agit d'une voie de recherche extrêmement prometteuse.

Les bactériophages

Historique

La première description des bactériophages est bien antérieure à celle des antibiotiques puisqu'elle remonte en 1896 où Ernest Hankin découvre une activité antibactérienne « filtrable et sensible à la chaleur », capable de tuer *Vibrio cholerae* dans les eaux du Gange et de la rivière Jumna. Ce n'est qu'en 1915 où les bactériophages sont réellement décrits comme des virus parasitant les bactéries sur boîte d'agar par le bactériologiste anglais Frederick Twort, puis en 1917 par le scientifique franco-canadien Félix d'Herelle qui observa un lien entre le titre de phages contenus dans les selles de patients atteints de dysenterie ou fièvre typhoïde et leur guérison. Ces observations indirectes ont été controversées, notamment par Jules Bordet, scientifique ayant obtenu le prix Nobel en 1919, considérant qu'il s'agissait d'une probable activité enzymatique ou chimique, jusqu'en 1940 où la microscopie électronique a permis la visualisation des bactériophages. À ce moment là, Félix d'Herelle commercialisait les premières préparations de bactériophages à visée curative, par la Société Française de Teinture Inoffensive pour Cheveux, actuellement L'Oréal. Celles-ci ont été utilisées initialement mais n'ont pas connu un grand essor du fait de l'arrivée des sulfonamides et de la pénicilline [70-72]. Par contre, leur utilisation s'est poursuivie dans les pays de l'Europe de l'Est (Russie, Géorgie, Pologne, etc.), jusqu'à ce jour où de nombreuses préparations sont disponibles en pharmacie. Les bactériophages ont regagné de l'intérêt ces dernières années, du fait de l'émergence et de la diffusion des bactéries multirésistantes dans le monde entier et du déclin constant de l'arrivée de nouveaux antibiotiques.

Biologie et mécanisme d'action

Les bactériophages sont probablement l'espèce vivante la plus nombreuse dans la biosphère, estimée de $1,10^{30}$ à $1,10^{32}$ particules. Ces virus bactériens sont ubiquitaires, avec par exemple $1,10^6$ particules par goutte d'eau de mer ou $1,10^8$ particules par gramme de terre, ils détruisent la moitié de la population bactérienne toutes les 48 heures sur la Terre. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des bactéries et exercent donc une pression extrêmement importante

sur le taux de mutations bactériennes, dont dépend la survie de l'espèce bactérienne [70].

Leur structure est composée d'un acide nucléique, ADN double brin le plus souvent, entouré d'une capsule protéique ou lipoprotéique, la capsid. Leur taille varie de 24 à 200 nm et plus de 95 % d'entre eux sont flagellés. Ils adhèrent aux bactéries via des récepteurs de surface, leur conférant une affinité pour un groupe de bactéries pouvant contenir plus d'une espèce, mais aussi être spécifique d'une seule souche. Après contact d'un bactériophage avec la cellule bactérienne, trois schémas sont possibles :

- la bactérie résiste à l'infection soit par l'absence de récepteur, soit par la dégradation enzymatique de l'acide nucléique ;
- l'acide nucléique pénètre dans la bactérie, il est transcrit par la machinerie bactérienne donnant naissance à des virions complets. Le cycle est dit productif et le phage est qualifié de virulent. Selon les bactériophages, ce cycle peut conduire soit à une lyse de la bactérie par l'action des muréines (endolysines) et des holines (protéines formant un pore membranaire), soit à un bourgeonnement des phages à la membrane bactérienne, transformant la bactérie infectée en une usine de production continue ;
- l'acide nucléique pénètre dans la bactérie, s'intègre dans le génome bactérien où il persiste à l'état quiescent sous forme de prophage et se réplique avec celui-ci. Le cycle est dit lysogénique et le bactériophage est appelé phage tempéré [73,74].

Les phages peuvent porter dans leur génome des gènes accessoires à leur cycle de vie, ils participent ainsi aux transferts horizontaux de gènes entre populations bactériennes. Lorsque ces gènes accessoires codent pour des facteurs de virulence, la bactérie infectée voit son pouvoir pathogène modifié, ce phénomène est qualifié de « conversion lysogénique ». Il existe de nombreux exemples de conversion lysogénique, tels que les toxines Stx d'*Escherichia coli* entéro-hémorragique dont les gènes sont situés dans des séquences de bactériophages intégrés dans le génome, la toxine cholérique de *Vibrio cholerae* qui est portée par le phage CTX, la toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae* lié au prophage tempéré β , ou encore la toxine érythro-gène de *Streptococcus pyogenes*, la staphylokinase et l'entérotoxine A de *Staphylococcus aureus*, ou les neurotoxines C et D de *Clostridium botulinum*.

La conversion lysogénique peut aussi conduire à des modifications antigéniques, tel que cela est décrit chez les salmonelles ou des modifications de sensibilité aux antibiotiques si le phénomène de transduction concerne des gènes de résistance aux antibiotiques.

Grâce à ces propriétés, les bactériophages sont depuis longtemps utilisés dans le domaine de la biologie moléculaire comme vecteurs et amplificateurs de gènes (outil de

clonage, séquençage de génome, banque d'ADN, méthode du *phage display*).

Utilisation clinique potentielle comme agent anti-infectieux

La phagothérapie a été utilisée pour la première fois en 1921 en injection intralésionnelle directe chez six patients présentant des furoncles à staphylocoque doré. D'Herelle conduisit en quelque sorte un essai clinique de phase I en administrant, d'abord par ingestion, puis par injection sous-cutanée des bactériophages sur lui-même, des membres de sa famille et des collègues de travail, avant de les utiliser dans le traitement de cas de dysenterie, de choléra et de peste bubonique.

Depuis, de nombreuses études in vitro et in vivo animales sont rapportées dans la littérature, en administration parentérale, orale, en topique local (cutanée, auriculaire, dentaire), en aérosol ou dans la prévention des biofilms sur des dispositifs médicaux. Les agents bactériens ciblés dans ces études sont principalement *Escherichia coli*, *Campilobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine, *Staphylococcus aureus* incluant les souches résistantes à la méticilline, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*. Deux revues de la littérature très complètes sur le sujet ont été publiées en 2009 [71,75].

La plus grande expérience de phagothérapie se situe en Europe de l'Est, principalement Russie, Géorgie et Pologne, avec des résultats d'études cliniques non accessibles dans la littérature médicale internationale. Le « *Eliava Institute* » en Géorgie est probablement le centre qui possède la plus grande expérience dans l'utilisation des bactériophages en termes de thérapie, de prophylaxie et d'outil diagnostique. L'expérience de ce centre a été rapportée dans une courte publication, rendant leurs résultats enfin accessibles. Un nombre considérable d'applications cliniques est rapporté, avec des résultats positifs, notamment dans la prophylaxie des diarrhées bactériennes de l'enfant dont la fièvre typhoïde et le traitement de diverses infections à *S. aureus*, y compris des chocs septiques, mais ces études sont non contrôlées et associaient parfois un traitement antibiotique [76].

Slopek et al. publiaient en 1987 une série de 550 patients traités par phagothérapie pour des infections purulentes entre 1981 et 1986 [77]. La guérison était obtenue dans 92,4 %. La même équipe publiait en 2000 une série similaire mais plus importante, incluant 1307 patients qui présentaient toujours une large variété d'infections bactériennes (*Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*...), avec un taux de guérison de 85,9 % [78]. Cette équipe très active sur le sujet a également publié une petite étude de 31 cas d'infections cutanées suppurées où le traitement a été interrompu dans 23 % des cas, du fait soit d'un échec, soit d'effets

secondaires. D'autres études ont été publiées dans ces indications [78,79]. Plus récemment, la phagothérapie a été proposée dans le cadre de bactériémies liées à des pathogènes multirésistants sur un collectif de 94 patients [80], soit seule, soit associée aux antibiotiques. Une efficacité thérapeutique fut obtenue dans 85,1 % des cas.

Un pansement imprégné d'une formulation associant antibiotiques et bactériophages actifs sur *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* et *Streptococcus spp.*, développé dans le « *Eliava Institute* » (PhageBioderm[®]), breveté et commercialisé par Intralytix, a fait l'objet d'une étude de phase 1 dans le traitement d'ulcères veineux chroniques infectés. Il s'agissait d'une petite étude incluant 39 patients traités pendant 12 semaines versus placebo et suivis pendant 24 semaines au total. Cette étude a permis de conclure à l'absence d'effets secondaires, mais l'efficacité du pansement doit être évaluée dans une étude de phase 2 [81].

Une autre combinaison de huit phages a fait l'objet d'une étude prospective, randomisée en double aveugle contre placebo, financée par le *National Institute of Health* (NIH) en 2008. Cette étude incluait 64 patients présentant des ulcères cutanés ; elle est actuellement clôturée mais pas encore publiée (NCT00663091). Une autre étude clinique retient notre attention, dans le traitement des otites chroniques évoluant depuis plusieurs années à *P. aeruginosa*. Il s'agissait d'une étude de phase 1/2, randomisée, en double aveugle contre placebo, incluant 24 patients. Tous présentaient une otite chronique avec une souche de *P. aeruginosa* sensible à au moins l'un des six bactériophages présents dans la préparation (Biophage-PA[®], Biocontrol Inc. Royaume-Uni) en application locale unique. Après un suivi de 42 jours, aucun effet secondaire n'a été rapporté. Les résultats permettent de conclure à une amélioration des symptômes et une diminution significative de l'inoculum bactérien [82].

Pour terminer, une étude publiée en 2011 a établi dans la mucoviscidose une relation entre les bactériophages et le développement des résistances bactériennes, cette approche ouvre de nombreuses perspectives sur la modulation de la résistance [83].

Sur l'ensemble de cette littérature, si les phages semblent avoir une efficacité indéniable, il existe un manque cruel d'études randomisées en double aveugle permettant d'apporter un niveau de preuve optimal.

Avantages et inconvénients de la phagothérapie

La phagothérapie se heurte à quelques obstacles majeurs :

- le scepticisme quant à la rigueur des essais cliniques précédents ;
- leur champ d'action actuel limité ;
- la sélection rapide de mutants résistants bactériens ;

- les contraintes quant à leur développement comme des thérapeutiques cliniques ;
- la voie d'administration et les effets secondaires potentiels.

Les bactériophages représentent donc une source riche d'agents antibactériens, mais ne sont pas à l'abri du développement de mécanismes de résistance, dont le taux est équivalent à celui des antibiotiques. Un diagnostic bactériologique précis est nécessaire, du fait d'une certaine spécificité d'action des bactériophages et il est difficile de développer des phages à large spectre. Des questions demeurent en suspens quant à la toxicité possible et les effets secondaires immunologiques possibles, surtout en cas d'exposition itérative.

Par ailleurs, l'administration par voie orale de bactériophages a déjà fait l'objet de publications rapportant une translocation systémique.

Utilisation comme agent anti-infectieux non thérapeutique : domaine agro-alimentaire

L'utilisation des bactériophages a été autorisée en 2006 aux États-Unis par la *Food and Drug Administration* (FDA) comme conservateur alimentaire, notamment pour lutter contre la listériose avec l'utilisation d'une préparation à base de six bactériophages. Cette préparation a été évaluée sans danger, notamment vis-à-vis du risque allergénique ou immunologique. En 2009, l'*European Food Safety Authority* (EFSA) reconnaît le bénéfice potentiel de l'utilisation des bactériophages dans certaines conditions, mais ne peut conclure quant à la durée d'action et notamment l'efficacité en cas de recontamination [84].

Les probiotiques

Le terme « probiotique » fut introduit en 1965 par Lilly et Stillwell, en opposition aux antibiotiques, comme des facteurs microbiologiques capables de stimuler la croissance d'autres organismes comme ceux composant la flore intestinale. En 1989, Roy Fuller ajoute le fait que ces bactéries doivent être viables et induire un effet bénéfique sur l'hôte. Aujourd'hui, l'Organisation mondiale de la santé définit les probiotiques comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte [85].

En thérapeutique humaine, les probiotiques ont vu leur bénéfice établi dans un certain nombre de troubles gastro-intestinaux [86] comme les diarrhées aiguës de l'enfant, l'entérocolite ulcéro-nécrosante du nouveau-né, dans les cas de malabsorption de lactulose, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable, la prévention de la colite à *Clostridium difficile*, et enfin l'éradication d'*Helicobacter pylori*.

Mécanismes cellulaires à l'origine des effets bénéfiques sur l'hôte

Il reste encore de nombreux points à élucider concernant l'origine de l'effet bénéfique des probiotiques chez l'hôte. Cependant, leurs effets positifs sont actuellement attribués au fait qu'ils influencent le système immunitaire en modulant la composition de la flore microbienne naturelle de l'intestin [87,88]. Ces effets immunomodulateurs sont variés : activation des macrophages locaux, augmentation de la présentation des antigènes aux lymphocytes B, production accrue d'immunoglobulines A sécrétoires, modulation des profils de cytokines, diminution de réponse immune aux antigènes alimentaires. Les effets bénéfiques des probiotiques découlent également de mécanismes indépendants du système immunitaire proprement dit. En digérant les aliments dans la lumière digestive, les bactéries probiotiques diminuent l'accessibilité des bactéries pathogènes aux nutriments [89]. Les probiotiques produisent des substances antibiotiques naturelles comme la bactériocine [90], et altèrent le pH local générant un milieu défavorable à la prolifération des bactéries pathogènes [91]. Les probiotiques aident l'hôte à mieux réparer les muqueuses agressées par les bactéries invasives en participant à l'élimination des radicaux superoxydes toxiques pour les cellules eucaryotes [92] et en stimulant la couche protectrice de mucine [93]. Ainsi, les bactéries probiotiques améliorent la fonction de barrière de la muqueuse intestinale [94] et constituent une entrave supplémentaire à l'adhésion du pathogène [93,95]. De plus, les bactéries probiotiques dénaturent les toxines sécrétées par certains pathogènes [96]. Enfin, elles peuvent promouvoir la restauration de la flore intestinale après sa destruction au décours de diarrhées infectieuses ou de traitement antibiotique [97].

Application thérapeutique potentielle en secteur de réanimation

Les principales sources de bénéfices décrits avec les probiotiques chez le patient, hors secteur de réanimation, sont la diminution de durée de l'infection et une augmentation de la résistance de l'individu à la pathogénicité des microorganismes [98]. Les patients de réanimation semblent a priori de bons candidats pour bénéficier des intérêts d'un traitement par probiotique. En effet, leur flore commensale, altérée sous la pression d'antibiothérapie à large spectre, peut être le siège d'une prolifération substitutive de bactéries souvent multirésistantes et potentiellement opportunistes. Ainsi, la minimisation de la prolifération dans les voies aérodigestives des bactéries virulentes, la réduction de translocation bactérienne digestive et l'optimisation des défenses immunitaires innées par l'emploi de bactéries probiotiques pourrait trouver des applications en secteur de réanimation notamment dans la prévention de portage de bactéries multirésistantes

ou de pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) entre autres [99].

Malheureusement, peu d'éléments objectifs en pratique clinique viennent conforter ce rationnel. Chez les patients en hospitalisation conventionnelle, trois études ont échoué à démontrer l'efficacité des probiotiques à diminuer l'acquisition ou la durée de portage d'entérocoque résistant à la vancomycine [100-102]. De même, une étude menée chez les personnes âgées ne permet pas de démontrer le rôle protecteur des probiotiques sur le portage digestif d'*Escherichia coli* multirésistant aux antibiotiques [103]. Néanmoins, une étude récente, conduite en unité de soins intensifs, a établi que l'administration de *Lactobacillus plantarum* 299/299v était associée à un taux significativement diminué d'isolement de cocci à Gram positif et de *Pseudomonas aeruginosa* au détriment d'une augmentation d'isolement d'entérobactéries [104]. Concernant la prévention de la PAVM, Morrow et al. [105] viennent de décrire que l'administration oropharyngée ou gastrique chez 146 patients de *Lactobacillus rhamnosus* GG deux fois par jour était associée à une diminution des PAVM microbiologiquement documentée et une diminution significative du nombre de jours d'antibiotiques et de diarrhées à *Clostridium difficile* sans événements indésirables observés. Une méta-analyse récente [106] regroupant cinq essais cliniques randomisés révélait que l'administration de probiotiques réduisait les PAVM dans les services de réanimation et diminuait le portage trachéal de *Pseudomonas aeruginosa* toutefois sans réduire la durée de ventilation mécanique. Cette méta-analyse ne mettait pas en évidence ni diarrhée ni surmortalité attribuable à ce type d'approche. De manière générale, les études mettant en évidence un intérêt des probiotiques sont contrebalancées par d'autres qui ne mettent en évidence aucun bénéfice jusqu'à même démontrer qu'ils aggravent le pronostic des patients sévères [107]. Il est vrai que l'administration de probiotiques peut être potentiellement associée à des complications infectieuses comme des endocardites, des bactériémies, des abcès et infections de la peau et des tissus mous [108-111], particulièrement sévères chez le patient immunodéprimé [112]. La modulation par les probiotiques du système inflammatoire peut également s'avérer dangereuse. En effet, elle pourrait expliquer les constatations faites par Barraud et al. [113] qui mettaient en évidence, sur un collectif de 167 patients, une plus forte mortalité des patients les moins sévères malgré une diminution réelle des infections sur cathéter.

Peu de données existent sur l'effet immunologique des probiotiques en fonction de l'état de gravité des patients. De même, le rôle de l'immunité muqueuse et de la flore commensale sur le pronostic des patients de réanimation reste méconnu. Certains auteurs décrivent que les infections opportunistes et le développement de novo de la résistance antimicrobienne sont précédés d'une croissance accentuée des bactéries de la flore intestinale [114]. Donc, favoriser

la flore par l'utilisation de probiotiques dans ces conditions pourrait être totalement néfaste. Enfin, la limite des probiotiques, tant pour leur utilisation que pour leur évaluation en pratique clinique, est également liée à leur mode de commercialisation. En effet, les probiotiques sont actuellement considérés comme un complément alimentaire par la *Food and Drug Administration* et ne sont donc pas soumis aux mêmes règlements que les produits pharmaceutiques. Ainsi, les produits probiotiques commercialisés varient dans leur densité, dans leurs caractéristiques d'adhérence, de résistance aux acides biliaires et de la stabilité et viabilité lors du stockage [115]. En outre, les variations des propriétés d'adhérence de différentes souches de probiotiques peuvent expliquer des résultats contradictoires observés dans les essais cliniques [116]. À ces constatations s'ajoute le fait qu'on suppose que les probiotiques dans leur globalité ont la même action et les mêmes effets, or les espèces microbiennes dotées d'activité probiotique sont variées, allant d'espèces communes telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* jusqu'à des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* ou encore quelques souches de *Escherichia coli* et de *Bacillus*.

Il est donc urgent d'évaluer ces bactéries probiotiques dans des essais cliniques multicentriques conçus pour démontrer leur efficacité, cibler les patients susceptibles d'en bénéficier et confirmer leur innocuité, car cette approche thérapeutique reste attractive, surtout dans le contexte actuel de diminution d'efficacité des antibiotiques envers les bactéries multirésistantes.

Perspectives générales à court terme

Le principal avantage des immunothérapies est l'hyperspécificité ne générant ni sélection ni résistances aux autres antimicrobiens mais constituant également, avec le coût élevé, leur principal inconvénient du fait d'un spectre totalement restreint. Leur utilisation la plus imminente dans les années à venir est certainement en adjuvant dans des infections récidivantes telles que les infections à *C. difficile*, en traitement de recours pour des pathologies sévères spécifiques telles que le syndrome hémolytique et urémique à *E. coli* (STEC) ou en prophylaxie de PAVM chez des patients de réanimation colonisés à *P. aeruginosa*.

Concernant les inhibiteurs de *QS*, en attendant que les innombrables composés candidats passent l'épreuve des études précliniques, il est désespérant de constater qu'une molécule déjà disponible et ayant presque démontré son efficacité, l'azithromycine, reste en suspens faute d'intérêt de la part des industries pharmaceutiques. Les avantages d'inhibiteurs de *QS* pourraient être leur large champ d'application en tant qu'adjuvants dans les infections impliquant les biofilms.

La phagothérapie présente l'avantage d'être un traitement antimicrobien « vivant » avec une amplification in vivo proportionnelle à l'inoculum de pathogènes ciblés dans lesquels

les phages peuvent se multiplier. Cet avantage séduisant est toutefois à tempérer par des inconvénients en commun avec l'antibiothérapie conventionnelle tels que sélection et résistances et une spécificité d'action souvent limitée à une souche précise, imposant soit un temps de préparation extemporané inadapté au traitement des infections aiguës ou une utilisation de « cocktails » de phages élargissant le spectre. La phagothérapie présente le paradoxe d'être une thérapeutique déjà largement utilisée dans certains pays, mais qui ne peut franchir les rigueurs du circuit du médicament occidental sans repartir à zéro, réduisant les perspectives d'utilisation à court terme.

L'avantage majeur des probiotiques est le caractère pléiotrope de leurs effets qui vont de l'immunomodulation jusqu'à la restauration d'une fonction barrière épithéliale intestinale. Le désavantage majeur qui en découle est l'imprévisibilité des conséquences bénéfiques ou délétères de cette vaste immunomodulation via le microbiome, ce d'autant plus qu'une grande variété d'espèces et de formulations existent, rendant peu probable une large utilisation à court terme des probiotiques en réanimation.

Conclusion

Les thérapeutiques anti-infectieuses non antibiotiques représentent au jour d'aujourd'hui un enjeu majeur en clinique humaine. Nous observons depuis quelques années une augmentation claire des phénomènes de multirésistance, voire de pan-résistance avec des conséquences sur le pronostic vital des patients. Si le développement de nouvelles molécules permettrait de garder un espoir au siècle dernier, les conjonctions actuelles vont à l'encontre de cette hypothèse et font ainsi de ces thérapeutiques alternatives un enjeu majeur dans la prise en charge future des maladies infectieuses. Pour les plus anciennes de ces molécules, il semble cependant fondamental d'avoir une évaluation correspondant aux critères d'efficacité actuels avec des études cliniques solides.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Casadevall A, Scharff MD (1995) Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 21:150–61
2. Kaufmann SH (2007) The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol* 5:491–504
3. LaRocca TJ, Katona LI, Thanassi DG, Benach JL (2008) Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever *Borrelia* resides in its variable region. *J Immunol* 180:6222–8

4. Casadevall A, Pirofski LA (2003) Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24:474–8
5. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Rielman DA (2007) An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* 449:811–8
6. Beaugerie L, Petit JC (2004) Microbial–gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:337–52
7. Marra F, Lynd L, Coombes M, et al (2006) Does antibiotic exposure during infancy lead to development of asthma? A systematic review and metaanalysis. *Chest* 129:610–8
8. Taborda CP, Rivera J, Zaragoza O, Casadevall A (2003) More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. *J Immunol* 170:3621–30
9. Akiyama M, Oishi K, Tao M, et al (2000) Antibacterial properties of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 1 lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody (MAb) in a murine thigh infection model: combined effects of MAb and ceftazidime. *Microbiol Immunol* 44:629–35
10. Froude JW, Stiles B, Pelat T, Thullier P (2011) Antibodies for biodefense. *MAbs* 3:517–27
11. Schneemann A, Manchester M (2009) Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol* 4:35–43
12. Plotkin S, Grabenstein JD (2008) Countering anthrax: Vaccines and immunoglobulins. *Clin Infect Dis* 46:129–36
13. Kulshreshtha P, Bhatnagar R (2011) Inhibition of anthrax toxins with a bispecific monoclonal antibody that cross reacts with edema factor as well as lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Mol Immunol* 48:1958–65
14. Bitzan M (2009) Treatment options for HUS secondary to *Escherichia coli* O157:H7. *Kidney Int* 75:S62–S66
15. Bitzan M, Poole R, Mehran M, et al (2009) Safety and pharmacokinetics of chimeric anti-Shiga toxin 1 and anti-Shiga toxin 2 monoclonal antibodies in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3081–7
16. Dowling TC, Chavaillaz PA, Young DG, et al (2005) Phase I safety and pharmacokinetic study of chimeric murine-human monoclonal antibody cStx2 administered intravenously to healthy adult volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1808–12
17. Lapeyraque AL, Malina M, Fremaux-Bacchi V, et al (2011) Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med* 364:2561–3
18. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362:197–205
19. Weisman LE, Fischer GW, Thackray HM, et al (2009) Safety and pharmacokinetics of a chimerized anti-lipoteichoic acid monoclonal antibody in healthy adults. *Int Immunopharmacol* 9:639–44
20. Weisman L, Thackray H, Steinhorn R (2011) A randomized study of a monoclonal antibody (pagibaximab) to prevent staphylococcal sepsis. *Pediatrics* 128:271–9
21. Hetherington S, Texter M, Wenzel E, et al (2006) Phase I dose escalation study to evaluate the safety and pharmacokinetic profile of tefibazumab in subjects with end-stage renal disease requiring hemodialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3499–500
22. Weems JJ, Steinberg JP, Filler S, et al (2006) Phase II, randomized, double-blind, multicenter study comparing the safety and pharmacokinetics of tefibazumab to placebo for treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2751–5
23. Benjamin DK, Schelonka R, White R, et al (2006) A blinded, randomized, multicenter study of an intravenous *Staphylococcus aureus* immune globulin. *J Perinatol* 26:290–5
24. Rupp ME, Holley HP, Lutz J, et al (2007) Phase II, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of a polyclonal anti-*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide immune globulin in treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4249–54
25. Ragle BE, Bubeck Wardenburg J (2009) Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun* 77:2712–8
26. LeClaire RD, Hunt RE, Bavari S (2002) Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun* 70:2278–81
27. Larsen RA, Pappas PG, Perfect J, et al (2005) Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anticryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 49:952–8
28. Matthews R, Rigg G, Hodgetts S (2003) Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrobial Agents Chemother* 47:2208–16
29. Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S (1987) Isolation of immunodominant antigens from sera of patients with systemic candidiasis and characterization of serological response to *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 25:230–7
30. Kaufmann GF, Park J, Janda KD (2008) Bacterial quorum sensing: a new target for anti-infective immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* 8:719–24
31. Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, et al (2007) Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem Biol* 14:1119–27
32. Jones RN (2010) Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* 51(S1):S81–S87
33. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 36:78–91
34. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7:654–65
35. Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379–433
36. Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 54:735–74
37. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, et al (1999) Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* 5:392–8
38. Neely AN, Holder IA, Wiener-Kronish JP, Sawa T (2005) Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Burns* 31:153–8
39. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al (1999) Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 104:743–50
40. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, et al (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68:3998–4004
41. Ader F, Le Berre R, Faure K, et al (2005) Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system. *Infect Immun* 73:4263–71
42. Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, et al (2001) Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 183:1767–74
43. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, et al (2002) Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 30:521–8

44. Shaver CM, Hauser AR (2004) Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72:6969–77
45. Schulert GS, Feltman H, Rabin SDP, et al (2003) Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 188:1695–1706
46. Shime N, Sawa T, Fujimoto J, et al (2001) Therapeutic administration of anti-PcrV F(ab')₂ in sepsis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 167:5880–6
47. Faure K, Fujimoto J, Shimabukuro DW, et al (2003) Effects of monoclonal anti-PcrV antibody on *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury in a rat model. *J Immune Based Ther Vaccines* 1:2
48. Frank DW, Vallis A, Wiener-Kronish JP, et al (2002) Generation and characterization of a protective monoclonal antibody to *Pseudomonas aeruginosa* PcrV. *J Infect Dis* 186:64–73
49. Baer M, Sawa T, Flynn P, et al (2009) An engineered human antibody fab fragment specific for *Pseudomonas aeruginosa* PcrV antigen has potent antibacterial activity. *Infect Immun* 77:1083–90
50. Chastre J, Dugard A, Luyt CE, et al (2010) A Pilot Study Of The Humanized TM Anti-PcrV Monoclonal Antibody, KB001., in Mechanically-Ventilated (MV) Subjects Colonized With *Pseudomonas Aeruginosa* (Pa). *Am J Respir Crit Care Med* 181:A2274 EP
51. Lazar H, Horn MP, Zuercher AW, et al (2009) Pharmacokinetics and Safety Profile of the Human Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Serotype O11 Immunoglobulin M Monoclonal Antibody KBPA-101 in Healthy Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3442–6
52. Nooney L, Matthews RC, Burnie JP (2005) Evaluation of Mycograb[®], amphoterin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:19–29
53. Pachel J, Svoboda P, Jacobs F, et al (2006) A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 42:1404–13
54. Song Y, Baer M, Srinivasan R, Lima J, et al (2011) PcrV antibody–antibiotic combination improves survival in *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011 [In press]
55. Al-Hamad A, Burnie J, Upton M (2011) Enhancement of antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* using a polyclonal antibody developed against an ABC multidrug efflux pump. *Can J Microbiol* 57:820–8
56. Lindorfer MA, Nardin A, Foley PL, et al (2001) Targeting of *Pseudomonas aeruginosa* in the bloodstream with bispecific monoclonal antibodies. *J Immunol* 167:2240–9
57. Mohamed N, Clagett M, Li J, Jet al (2005) A high-affinity monoclonal antibody to anthrax protective antigen passively protects rabbits before and after aerosolized *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infect Immun* 73:795–802
58. Gyimesi E, Bankovich AJ, Schuman TA, et al (2004) *Staphylococcus aureus* bound to complement receptor 1 on human erythrocytes by bispecific monoclonal antibodies is phagocytosed by acceptor macrophages. *Immunol Lett* 95:185–92
59. Lai Z, Kimmel R, Petersen S, et al (2005) Multi-valent human monoclonal antibody preparation against *Pseudomonas aeruginosa* derived from transgenic mice containing human immunoglobulin loci is protective against fatal pseudomonas sepsis caused by multiple serotypes. *Vaccine* 23:3264–71
60. Nowakowski A (2002) Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11346–50
61. Dadachova E (2003) Ionizing radiation delivered by specific antibody is therapeutic against a fungal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10942–7
62. Dadachova E, Howell RW, Bryan RA, et al (2004) Susceptibility of the human pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* to gamma-radiation versus radioimmunotherapy with alpha- and beta-emitting radioisotopes. *J Nucl Med* 45:313–20
63. Dadachova E, Burns T, Bryan RA, et al (2004) Feasibility of radioimmunotherapy of experimental pneumococcal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1624–9
64. Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156:2271–82
65. Cirioni O, Ghiselli R, Minardi D, et al (2007) RNAIII-inhibiting peptide affects biofilm formation in a rat model of staphylococcal ureteral stent infection. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4518–20
66. Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, et al (2008) Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 14:337–43
67. Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, Meijler MM (2011) Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev* 111:195–208
68. Cushnie TP, Lamb AJ (2011) Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 38:99–107
69. Smyth AR, Cifelli PM, Ortori CA, et al (2010) Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in cystic fibrosis—a pilot randomized controlled trial. *Pediatr Pulmonol* 45:356–62
70. Deresinski S (2009) Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. *Clin Infect Dis* 48:1096–101
71. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 33:801–19
72. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:649–59
73. Harper DR, Enright MC (2011) Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Appl Microbiol* 111:1–7
74. Lu TK, Koeris MS (2011) The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol* 14:524–31
75. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF (2011) Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol* 63:1253–64
76. Kutateladze M, Adamia R (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect* 38:426–30
77. Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A (1987) Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 35:569–83
78. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A (2000) Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48:547–51
79. Cisko M, Dabrowski M, Weber-Dabrowska B, Woytoń A (1987) Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 35:175–83
80. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A (2003) Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant Proc* 35:1385–6
81. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, et al (2009) Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care* 18:237–8

82. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 34:349–57
83. Rolain JM, Fancello L, Desnues C, Raoult D (2011) Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 66:2444–7
84. Mahony J, McAuliffe O, Ross RP, van Sinderen D (2011) Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr Opin Biotechnol* 22:157–63
85. WHO F. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 30AD
86. Yan F, Polk DB (2010) Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 26:95–101
87. Ghosh S, van Heel D, Playford RJ (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? *Gut* 53:620–2
88. Isolauri E (2001) Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 73:1142S–1146S
89. Majamaa H, Isolauri E (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99:179–85
90. Zamfir M, Callewaert R, Cornea, PC, et al (1999) Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *J Appl Microbiol* 87:923–31
91. Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, et al (1998) Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 93:2097–101
92. Akisu M, Baka M, Yalaz M, et al (2003) Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur J Pediatr Surg* 13:319–23
93. Otte JM, Podolsky DK (2004) Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G613–26
94. Gionchetti P, Lammers KM, Rizzello F, Campieri M (2005) Probiotics and barrier function in colitis. *Gut* 54:898–900
95. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35:483–9
96. Paton AW, Jennings MP, Morona R, et al (2005) Recombinant probiotics for treatment and prevention of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Gastroenterology* 128:1219–28
97. Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, et al (2007) Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 335:80
98. Ohland CL, Macnaughton WK (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G807–19
99. Walker WA (2008) Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis* 46(Suppl 2):S87–91
100. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA (2007) Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust* 186:454–7
101. de Regt MJ, Willems RJ, Hene RJ, et al (2010) Effects of probiotics on acquisition and spread of multiresistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2801–5
102. Vidal M, Forestier C, Charbonnel N, et al (2010) Probiotics and intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in mice and humans. *J Clin Microbiol* 48:2595–8
103. Tannock GW, Tiong IS, Priest P, et al (2011) Testing probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor) for its ability to reduce carriage of multidrug-resistant *E. coli* by elderly residents in long-term care facilities. *J Med Microbiol* 60:366–70
104. Oudhuis GJ, Bergmans DC, Dormans T, et al (2010) Probiotics versus antibiotic decontamination of the digestive tract: infection and mortality. *Intensive Care Med* 37:110–7
105. Morrow LE, Kollef MH, Casale TB (2010) Probiotic prophylaxis of ventilator-associated pneumonia: a blinded, randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182:1058–64
106. Siempos, Athanassa Z, Falagas ME (2008) Frequency and predictors of ventilator-associated pneumonia recurrence: a meta-analysis. *Shock* 30:487–95
107. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, et al (2008) Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371:651–9
108. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL (1997) *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis* 25:1048–55
109. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, et al (1999) Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 28:1159–60
110. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, et al (2005) *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115:178–81
111. Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP (2004) Two cases of *Lactobacillus* bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:457–8
112. Jones SD, Fullerton DA, Zamora MR, et al (1994) Transmission of *Lactobacillus* pneumonia by a transplanted lung. *Ann Thorac Surg* 58:887–9
113. Barraud D, Blard C, Hein F, et al (2010) Probiotics in the critically ill patient: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Intensive Care Med* 36:1540–7
114. van Saene HK, Taylor N, Damjanovic V, Sarginson RE (2008) Microbial gut overgrowth guarantees increased spontaneous mutation leading to polyclonality and antibiotic resistance in the critically ill. *Curr Drug Targets* 9:419–21
115. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, et al (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl):393S–398S
116. Clements ML, Levine MM, Ristaino PA, et al (1983) Exogenous lactobacilli fed to man. Their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Prog Food Nutr Sci* 7:29–37