

Université de Montréal

**Isolement et caractérisation de bactériophages comme
moyen de lutte naturel contre les infections
nosocomiales**

par

Annie Martineau

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Microbiologie et Immunologie

Avril 2009

© Annie Martineau, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Isolement et caractérisation de bactériophages comme
moyen de lutte naturel contre les infections
nosocomiales**

présenté par :
Annie Martineau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr George Szatmari, président-rapporteur
Dr Gilbert Pichette, directeur de recherche
Dre Béatrice Allain, codirectrice
Dre Josée Harel, membre du jury

RÉSUMÉ

Les infections nosocomiales sont causées par des germes opportunistes souvent résistants aux antibiotiques et persistants sur les surfaces, représentant une source constante de risque d'infection en milieu hospitalier. Dans ce contexte, l'isolement et la caractérisation de bactériophages s'attaquant spécifiquement aux bactéries nosocomiales telles que *Staphylococcus aureus* résistant (SARM), *Enterococcus* résistant (ERV), *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*, pourraient fournir une alternative bactéricide naturelle contre la transmission de ces infections. Des phages isolés des eaux usées, ont été sélectionnés selon leur capacité d'amplification, leur profil génomique et leur potentiel lytique envers différentes souches bactériennes cliniques. Les meilleurs ont été caractérisés en détail pour s'assurer de leur spécificité, sécurité, stabilité et efficacité préalablement à leur utilisation *in vivo*. Sept phages contre SARM et trois contre *Acinetobacter baumannii* ont été caractérisés. Quatre phages SARM s'avèrent être de bons candidats potentiels et pourraient être testés en milieu hospitalier comme agents désinfectants dans le but de lutter contre les infections nosocomiales.

Mots-clés : Bactériophages, infections nosocomiales, transmission, hôpitaux, résistance, antibiotiques.

ABSTRACT

Nosocomial infections are directly related to opportunistic germs, which are often resistant to antibiotics and persistent on surfaces, representing a high infectious risk in hospitals. In this context, the isolation and characterization of bacteriophages specifically targeting nosocomial bacteria such as resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), resistant *Enterococcus* (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, could provide a natural bactericidal alternative against the transmission of these infections. Phages, isolated from waste water, were selected according to their capacity of amplification, their genomic profile and lytic potential towards various bacterial clinical strains. The best ones were characterized in detail to primarily ensure their specificity, safety, stability and effectiveness, before studying their *in vivo* usage. Seven phages against MRSA and three against *Acinetobacter baumannii* were characterized. Four MRSA phages proved to be good potential candidates and could be tested in hospitals as disinfectant agents with the aim of fighting nosocomial infections.

Keywords : Bacteriophages, nosocomial infections, transmission, hospitals, resistance, antibiotics.

Table des matières

Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiii
1 INTRODUCTION	14
1.1 Les infections nosocomiales	14
1.1.1 Développement des infections nosocomiales	15
1.1.1.1 Agents infectieux.....	16
1.1.1.2 Milieu hospitalier	17
1.1.1.3 Réceptivité du patient	19
1.1.1.4 Mode de transmission	20
1.1.2 Principales infections nosocomiales.....	21
1.1.3 Conséquences.....	22
1.1.4 Prévention et contrôle des infections.....	23
1.1.5 Bactéries nosocomiales.....	25
1.1.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	25
1.1.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PsA)	26
1.1.5.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> (Aci).....	27
1.1.5.4 <i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine (ERV)	29
1.2 Persistance des bactéries sur les surfaces et désinfection de l'environnement hospitalier	30
1.2.1 Persistance des bactéries sur les surfaces	30
1.2.2 La désinfection.....	31
1.2.3 Les bactériophages pour une décontamination sélective.....	33
1.3 Les bactériophages	33

1.3.1	Définition	33
1.3.2	Structure.....	35
1.3.3	Historique.....	36
1.3.4	Avantages.....	38
1.3.5	Limites	39
1.3.6	La thérapie phagique	41
1.4	Problématique et Objectifs	45
2	MATÉRIEL ET MÉTHODE	47
2.1	Cultures bactériennes	48
2.2	Titration des phages	49
2.3	Isolement des bactériophages	49
2.4	Amplification des phages	50
2.5	Analyse du génome des phages	51
2.6	Spécificité des phages	52
2.7	Cinétique d'adsorption	53
2.8	Cinétique de réplication.....	53
2.9	Purification	54
2.10	Stabilité des phages	56
2.11	Microscopie électronique	56
2.12	Susceptibilité aux désinfectants	57
2.13	Sécurité.....	57
2.14	Efficacité <i>in vitro</i>	58
3	RÉSULTATS	59
3.1	Isolement des bactériophages	59
3.2	Sélection des bactériophages	61
3.2.1	Test d'amplification	61
3.2.2	Analyse du génome (profil de restriction)	62
3.2.3	Tests de spécificité	64

3.2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> (SaA)	64
3.2.3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PsA)	66
3.2.3.3	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine (ERV)	68
3.2.3.4	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Aci).....	69
3.3	Caractérisation des bactériophages	70
3.3.1	Cinétique d'adsorption	70
3.3.2	Cinétique de réplication.....	71
3.3.3	Amplification 250ml	75
3.3.4	Détermination des conditions de purification.....	77
3.3.5	Stabilité.....	78
3.3.6	Taille et profil du génome.....	80
3.3.7	Microscopie électronique.....	81
3.3.8	Susceptibilité aux désinfectants	83
3.3.9	Taux d'endotoxines	84
3.3.10	Détermination de la contamination bactérienne.....	85
3.3.11	Efficacité in vitro.....	85
4	DISCUSSION	87
4.1	SARM.....	89
4.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	95
4.3	Applications visées	99
4.4	Conclusion.....	102
	BIBLIOGRAPHIE	I

Liste des tableaux

Tableau I : Taux de mortalité et prolongement de séjour attribuables aux infections nosocomiales au Québec (2005).....	22
Tableau II : Persistance des bactéries nosocomiales sur les surfaces.....	31
Tableau III: Nombre d'isolats de phages obtenus par bactéries	59
Tableau IV: Total des isolats de phages par bactérie cible.....	60
Tableau V: Amplification des isolats de phages après 24h	61
Tableau VI: Digestion des isolats de phages	63
Tableau VII: Potentiel lytique de 7 phages SaA envers différentes souches bactériennes.....	65
Tableau VIII: Amplification croisée de 7 phages SaA avec toutes les souches de bactériennes de SaA	66
Tableau IX: Potentiel lytique des phages PsA envers différentes souches de PsA cliniques.....	67
Tableau X: Potentiel lytique des phages Ensp envers différentes souches d' <i>Enterococcus</i> sp. cliniques.....	68
Tableau XI: Potentiel lytique des phages Aci envers différentes souches bactériennes.....	69
Tableau XII: Temps de contact qui permet l'adhésion de 99% du phage à sa bactérie hôte	71
Tableau XIII: Titre des phages après 6 h d'amplification dans 250 ml de LB à 37°C (ufp/ml)	76
Tableau XIV : Pourcentage de récupération des principaux phages après purification par centrifugation à différentes vitesses pendant 1 h à 4°C et par TFF.....	77
Tableau XV : Stabilité des phages SaA en milieu LB et tampon SM à différentes températures (10 ⁸ ufp/ml)	79

Tableau XVI: Stabilité des phages <i>Acinetobacter baumannii</i> en milieu LB et tampon SM à différentes températures (10^8 ufp/ml).....	80
Tableau XVII: Taille génomique des principaux phages (kb).....	81
Tableau XVIII : Effet de différents désinfectants utilisés dans le milieu hospitalier sur les principaux phages	83
Tableau XIX: Taux d'endotoxines des phages Aci (10^8 ufp/ml).....	84
Tableau XX : Efficacité <i>in vitro</i> des phages en milieu LB	86

Liste des figures

Figure 1 : Chaîne de transmission	16
Figure 2 : Structure du phage T4.....	36
Figure 3 : Processus de sélection d'un bactériophage	47
Figure 4 : Processus de caractérisation d'un bactériophage	48
Figure 5: Écoulements comparés de fluides en filtrations frontale et tangentielle	55
Figure 6: Cinétique de répllication du phage BP14 en milieu LB à 37°C pendant 24 h à différents MOI.....	72
Figure 7: Cinétique de répllication du phage BP15 en LB à 37°C pendant 24 h à différents MOI.....	73
Figure 8: Cinétique de répllication des phages SaA à 37°C en milieu LB pendant 24 h à un MOI de 0,001	74
Figure 9: Cinétique de répllication des phages Aci à 37°C en milieu LB pendant 24 h à un MOI de 0,001	75
Figure 10 : Microscopie électronique du phage BP14	82
Figure 11 : Effets potentiels des phages sur la chaîne de transmission des infections nosocomiales	99

Liste des sigles et abréviations

Ab	Antibiotique
Aci :	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADVIN :	Association Des Victimes des Infections Nosocomiales
ARN :	acide ribonucléique
ASPC :	Agence de Santé Publique du Canada
BPx :	bactériophage #
Ensp :	<i>Enterococcus</i> sp.
ERV :	<i>Enterococcus</i> résistant à la vancomycine
EU/ml :	unité d'endotoxine/millilitre
FBS :	"foetal bovine serum"
FDA :	"Food and Drug Administration"
FIGE :	"Field Inversion Gel Electrophoresis"
g :	gramme
h :	heure
HSCM :	Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal
i.p. :	intrapéritonéal
ICTV :	"International Committee on Taxonomy of Viruses"
IN :	infection nosocomiale
INSPQ :	Institut National de Santé Publique du Québec
kDa :	kilodalton
Kpb:	kilo paire de bases
LAL :	"Limulus amebocyte lysate"
LB :	milieu Luria-Bertani
min :	minute

ml :	millilitre
MOI :	"multiplicity of infection"
MSSS :	Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec
nm:	nanomètre
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
PEG :	polyéthylène glycol
PsA :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RT :	température pièce
SaA :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SaE :	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SASM :	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méthicilline
sem :	semaine
SM :	sodium-magnésium
TE :	Tris-HCl-EDTA
TMN :	Tris-HCl-MgSO ₄ -NaCl
ufc :	unité formatrice de colonie
ufp :	unité formatrice de plage de lyse
µg :	microgramme
µl :	microlitre
µm :	micromètre

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier la présidente de Biophage Pharma, Mme Rosemonde Mandeville pour m'avoir donné la chance et le privilège de réaliser ma maîtrise au sein de son entreprise, ma superviseure et codirectrice de recherche, Béatrice Allain pour tout le temps qu'elle a consacré à la réalisation de ce projet, pour ses encouragements, son support, ses conseils et son aide précieuse tout au long de ma maîtrise. J'aimerais aussi remercier toute l'équipe de l'hôpital du Sacré-Cœur, particulièrement le Dr Gilbert Pichette, mon directeur de recherche, et Richard Massicotte pour leurs idées, leur temps et leur implication motivante et encourageante.

J'aimerais aussi remercier mes parents, mon beau-frère, ma belle-mère et mes amis pour leur aide, leur constant support moral et leurs encouragements ainsi que mon amoureux Olivier qui, malgré qu'il ait subi les conséquences du travail de maîtrise, a eu beaucoup de patience et a su me motiver sans cesse à poursuivre. Merci pour ton calme et ton amour...

1 INTRODUCTION

1.1 Les infections nosocomiales

Même si la médecine moderne accomplit de nos jours de grands succès, il arrive que les hôpitaux représentent un lieu d'où l'on peut sortir plus malade qu'à l'arrivée. À l'ère de la médecine ultra sophistiquée, mourir à l'hôpital après y avoir contracté une infection, constitue la quatrième cause de mortalité au Québec après les infarctus, les maladies cardiovasculaires et les cancers. On compte jusqu'à 3 000 décès dus aux infections nosocomiales et de 80 000 à 90 000 victimes, souvent handicapées à vie (Courchesne, 2004; MSSS, 2008). Les chiffres de l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2006) démontrent l'ampleur du problème dans le monde puisqu'elle estime qu'à chaque année, 1,4 million de personnes seraient ainsi infectées, entraînant près de 500 000 décès et faisant des infections nosocomiales, la deuxième cause de mortalité dans le monde après le cancer (Vallée, 2007). Elles représentent donc un problème de santé publique majeur international par leur fréquence, leur gravité ainsi que leur coût.

De façon générale, une infection est dite nosocomiale (du latin « *nosocomium* », hôpital, du grec « *nosos* », maladie et « *komein* », soigner) si elle est absente lors de l'admission du patient à l'hôpital et qu'elle se développe au moins 48h après la prestation de soins. Si l'infection apparaît moins de 48h après l'admission, elle était probablement déjà en incubation et elle n'est pas considérée nosocomiale. Pour les interventions chirurgicales, on considère comme nosocomiales les infections survenant dans les 30 jours

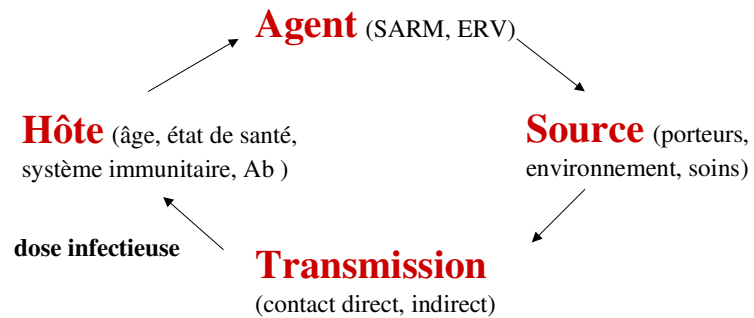
suivant la chirurgie, sauf s'il y a eu mise en place d'une prothèse ou d'un implant pour lesquels le délai passe à un an (MSSS, 2005; Wenzel, 2007).

L'infection nosocomiale peut être d'origine endogène, c'est-à-dire que le patient est déjà porteur de la bactérie pouvant causer un risque d'infection, mais asymptomatique. C'est lors d'un acte chirurgical invasif que la ou les bactéries ont l'opportunité de générer une infection. Les infections d'origine endogène représentent au moins 50% des infections nosocomiales. L'infection exogène est causée par un germe présent à l'hôpital, transmis au patient à partir d'un malade, du personnel soignant porteur, des visiteurs ou de la contamination des surfaces de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation, etc.) (Faure, 2002).

1.1.1 Développement des infections nosocomiales

Le développement d'une infection nosocomiale nécessite la présence de quatre éléments constituant la chaîne de transmission: un germe infectieux, une source (humain, environnement), un mode de transmission et un sujet susceptible (figure 1).

Figure 1 : Chaîne de transmission



1.1.1.1 Agents infectieux

Les agents infectieux responsables des infections nosocomiales sont multiples : bactérie, virus, moisissure, protozoaire. Cependant, deux tiers des cas implique les bactéries dont la plupart ne sont pas invasives et font partie de la flore saprophyte (endogène). L'être humain est porteur d'un plus grand nombre de microorganismes que de cellules. Ces bactéries commensales qui se retrouvent entre autre sur la peau, dans le tube digestif, la bouche et les narines sont utiles au bon fonctionnement du corps humain mais peuvent devenir pathogènes, si elles se retrouvent dans un endroit à risque (par exemple dans la cavité abdominale habituellement stérile); ce sont des bactéries opportunistes. Les plus connues sont *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile*, mais il y a aussi *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* qui sont fréquemment en cause lors d'infections nosocomiales (Prescott, 1995; Dancer, 1999).

1.1.1.2 Milieu hospitalier

À la flore endogène du patient, s'ajoute celle de l'hôpital qui constitue une source d'acquisition exogène. L'hôpital accueille une vaste population et constitue un milieu d'interactions complexes entre le patient, les interventions qu'il subit et l'environnement hospitalier. Il met en présence des patients présentant des pathologies différentes, infectieuses ou non, pouvant être plus vulnérables aux infections ou encore, être eux-même porteurs d'une infection transmissible. La condition physique et la flore microbienne du patient, le traitement administré et l'instrumentation utilisée pour les soins sont tous des facteurs ayant une incidence sur le risque d'acquisition et de transmission d'une infection qui se situe entre 5 et 10 % au Québec (MSSS, 2005; Courchesne, 2004).

Plusieurs facteurs ont contribué à l'augmentation de 36% des infections nosocomiales entre 1975 et 1995 : la croissance des admissions à l'hôpital, l'augmentation des patients immunosupprimés qui sont plus sensibles à l'infection, la promiscuité des patients, les salles de bain partagées, la surcharge du personnel hospitalier, les immeubles et les infrastructures vétustes, le vieillissement de la population, la médecine de plus en plus invasive ainsi que les lacunes au niveau de l'hygiène et de la désinfection du matériel (Weinstein, 1998; MSSS, 2005). Récemment, une enquête menée par des chercheurs de l'Université Queens en Ontario, démontre que, dans les hôpitaux canadiens entre 1999 et 2005, le taux de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) a plus que doublé et que les nouveaux cas d'infections par les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) ont augmenté de 77%. Ces

résultats démontrent que les programmes de contrôle actuels ne sont peut-être pas à la hauteur de ce que les experts avaient proposés (Zoutman, Douglas Ford, 2008).

La Résistance aux antibiotiques

L'environnement hospitalier est un milieu favorisant le développement de différentes populations microbiennes. Tout comme dans un écosystème naturel, ces populations s'adaptent aux conditions présentes. La flore ainsi formée évolue en fonction des capacités de résistance de chaque bactérie, des antiseptiques utilisés pour le nettoyage ainsi que des antibiotiques prescrits dans l'établissement. Cette flore subit donc une pression de sélection : seules les bactéries les plus résistantes survivent. Les germes hospitaliers sont en général, aptes à survivre dans un milieu hostile et à développer une résistance aux antibiotiques couramment utilisés en acquérant des mutations génomiques de manière naturelle ou du matériel génétique par des organismes de leur environnement (Henderson, 2006). Plus un antibiotique est utilisé, plus un grand nombre de bactéries sont tuées sauf les bactéries résistantes qui peuvent ainsi se développer et se répandre dans les établissements de soins. Le même schéma peut se répéter plusieurs fois et donner lieu à une résistance à plusieurs antibiotiques. De surcroît, ce phénomène s'amplifie en absence de mesures d'hygiène et d'entretien rigoureux, car ce manque de rigueur lève temporairement la pression sélective et permet une multiplication plus rapide, surtout pour les bactéries plus fortes donc celles qui sont résistantes aux antibiotiques. Ces dernières, particulièrement le SARM, l'ERV et l'*E. coli*, peuvent alors se transmettre à des personnes qui ne sont pas sous traitement.

Selon un rapport de l’OMS, 60% des infections nosocomiales sont causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Rosner et al., 2004). L’utilisation très répandue ou la surconsommation des antibiotiques, surtout ceux à large spectre à des fins thérapeutiques et prophylactiques, parfois sans indication pertinente, constitue le principal déterminant du développement de la résistance bactérienne (Henderson, 2006). La corrélation entre la surconsommation d’antibiotiques et les taux d’infections nosocomiales a été décrite dans plusieurs publications surtout dans le cas du SARM (Henderson, 2006; Muto et al., 2003; Graffunder et al., 2002). Une étude démontre même que la flore normale d’un patient change à l’intérieur de 24 à 48 h sous pression sélective des antibiotiques (Schentag et al., 1998). Les bactéries résistent, les antibiotiques sont de moins en moins efficaces, c’est un fait désormais connu de tous. Le traitement des infections nosocomiales est donc devenu de plus en plus problématique.

1.1.1.3 Réceptivité du patient

Plusieurs facteurs peuvent rendre le patient plus susceptible aux infections nosocomiales : son âge, son statut immunitaire, sa pathologie sous-jacente ainsi que les interventions diagnostiques et thérapeutiques qu’il subit. Les très jeunes enfants et les personnes âgées sont associés à une résistance réduite aux infections de même que les malades chroniques comme les leucémiques. Les infections peuvent être causées par des microorganismes, inoffensifs en temps normal et qui deviennent pathogènes lorsque les défenses immunitaires sont réduites. De plus, certaines techniques diagnostiques invasives ou traitements peuvent accroître le risque d’infection nosocomiale

comme la pose d'un cathéter, la biopsie, l'endoscopie, l'intubation ainsi que toute intervention chirurgicale.

Il est important de faire la distinction entre une personne malade, infectée et colonisée. La personne malade présente les symptômes d'infection : fièvre, rougeur, enflure, pus, etc. La personne infectée peut avoir une réaction active du système immunitaire sans nécessairement avoir de symptômes (chlamydie asymptomatique chez la femme avec stérilité secondaire par exemple). La personne colonisée, quant à elle, est porteuse du microorganisme pathogène mais elle ne présente aucun symptôme d'infection ou réaction immunitaire (MSSS, 2005).

1.1.1.4 Mode de transmission

Il existe cinq modes de transmission des microorganismes : par contact direct ou indirect, par gouttelettes (toux, éternuement), par aérosols (ou voie aérienne), par un véhicule commun (source unique, comme la nourriture par exemple) et par un vecteur (insecte) (MSSS, 2005).

La transmission par les mains du personnel soignant est le meilleur exemple de transmission par contact direct. Ce mode de transmission qui est le plus répandu, nécessite un contact physique entre une personne infectée ou colonisée et un hôte réceptif (ex. : SARM). Dans la transmission par contact indirect, un hôte réceptif entre en contact avec un objet ou une surface

contaminé qui sert de vecteur de transmission (ex. : spores de *C. difficile*). La transmission par gouttelettes projetées dans l'air sur une courte distance (moins d'un mètre), d'un patient infecté à la muqueuse nasale ou buccale d'un autre patient est plus rare. L'influenza, par exemple peut se transmettre de cette manière. La transmission par voie aérienne désigne la dissémination de microorganismes dans l'air qui peuvent rester en suspension pendant de longues périodes (ex. : tuberculose, varicelle, rubéole).

En résumé, une infection nosocomiale est toujours le résultat d'interactions complexes entre l'hôte, sa condition clinique de base, les interventions qu'il subit, sa flore microbienne, l'environnement hospitalier et les modes de transmission des microorganismes.

1.1.2 Principales infections nosocomiales

Au Québec, les infections urinaires sont les infections nosocomiales les plus fréquentes (33%) parmi lesquelles 70 à 80% sont associées à l'utilisation de cathéters urinaires. On retrouve ensuite les pneumonies nosocomiales (16%), les infections de site chirurgical (15%) auxquelles s'ajoutent les bactériémies ou infections du sang (13%), les infections de la peau, des tissus mous, du système digestif, du nez, de la gorge, des yeux et des oreilles ainsi que l'influenza et les autres virus respiratoires (MSSS, 2005).

Tableau I : Taux de mortalité et prolongement de séjour attribuables aux infections nosocomiales au Québec (2005)

	Taux de mortalité (%)	Prolongement moyen (jours)
Infections urinaires	0,5 - 4	4-16
Pneumonies nosocomiales	7	6 –7
Infections chirurgicales	0,5 – 4,3	6 – 7
Bactériémies nosocomiales	5	8,5 – 22

(Adapté de Gourdeau, Tremblay, Frenette, 2005)

1.1.3 Conséquences

Outre l'impact majeur sur les personnes atteintes et leur famille, en termes de mortalité, de morbidité et de qualité de vie, les infections nosocomiales entraînent un surcoût financier important, essentiellement dû à un prolongement de la durée d'hospitalisation, au traitement anti-infectieux, aux examens de laboratoire nécessaires au diagnostic et à la surveillance de l'infection. Ainsi, elles ont aussi un impact important sur l'accessibilité aux soins hospitaliers en allongeant la durée de séjour, mobilisant des lits et diminuant ainsi l'offre de soins (Tableau I). Elles entraînent un gaspillage des ressources attribuées à la santé dans le contexte des contraintes budgétaires consécutives à l'explosion des coûts de la santé, au Québec, comme partout dans le monde.

Les infections nosocomiales constituent autant un fardeau financier pour la personne atteinte et sa famille que pour l'établissement de santé et la société (séjour prolongé à l'hôpital, soins additionnels, journées de travail perdues, invalidité, etc.). Leur coût serait évalué à 180 millions de dollars par année pour le système de santé québécois (MSSS, 2005). On estime que de 30 à 60% des patients hospitalisés colonisés par le SARM présenteront une infection à cette bactérie en générant un surcoût de 1 360 \$ par séjour hospitalier. Le coût attribuable au traitement d'une infection au SARM serait évalué à 14 360 \$ avec une prolongation de séjour de 14 jours. En présence d'une bactériémie, ce coût passerait à 28 000 \$ (INSPQ, 2006).

1.1.4 Prévention et contrôle des infections

La létalité et le coût économique liés aux infections nosocomiales sont des éléments essentiels motivant la mise en place d'une politique de prévention de ces infections. La prévention et le contrôle des infections nosocomiales passent par la surveillance et l'adoption de mesures d'hygiène strictes : le lavage des mains, la désinfection du matériel, l'entretien de l'environnement, l'isolement septique, la surveillance de l'usage des antibiotiques, la formation du personnel médical, etc. L'hygiène ne doit pas être un supplément aux soins, mais elle doit en être constitutive (Mahamat et al., 2007; Miyachi et al., 2007).

Pour prévenir les infections nosocomiales, il faut en premier lieu les reconnaître et les identifier par un programme de surveillance. Une étude révèle une réduction de 30% des infections nosocomiales par la mise en place

d'un programme de surveillance structuré (MSSS, 2005). Ensuite, il faut mettre en œuvre les précautions de base pour tous les patients et des précautions additionnelles qui varient selon le mode de transmission des infections. D'abord, il est primordial que tout le personnel de l'hôpital comprenne le rôle important de la transmission des pathogènes nosocomiaux par les mains. Une hygiène adéquate des mains réduit clairement la transmission nosocomiale du SARM car peu de bactéries y résistent (Henderson, 2006). Comme un pourcentage élevé des infections nosocomiales est transmis par contact de surface, il s'agit donc d'une mesure essentielle au contrôle de la transmission (Curtis, 2008). Malheureusement, encore aujourd'hui, une étude récente locale rapportée dans « The Gazette » le 6 janvier 2009, révèle que 25% des médecins et plus de 40% des infirmières ne se lavent pas toujours les mains entre deux consultations. De plus, il a été prouvé que la désinfection des surfaces de l'environnement immédiat des patients diminue l'acquisition d'infections nosocomiales (Kramer et al., 2006). Si un organisme peut trouver une niche appropriée dans laquelle il peut survivre, il le fera; c'est pourquoi un nettoyage adéquat permet d'éliminer de telles niches et ainsi rompre la chaîne de transmission (Dancer, 1999).

L'environnement hospitalier est un écosystème complexe où la transmission des infections nosocomiales est multifactorielle, c'est pourquoi de nombreuses mesures doivent être prises pour un contrôle optimal des infections. D'autres stratégies pour lutter contre les infections nosocomiales, comme la décolonisation des porteurs, la répartition du personnel en fonction des patients et la rationalisation de l'usage des antibiotiques doivent être envisagées pour prévenir du même coup, la propagation de la résistance (Muto et al., 2003).

1.1.5 Bactéries nosocomiales

1.1.5.1 *Staphylococcus aureus* (SARM)

Les *Staphylococcus* sp. sont des cocci, Gram positif que l'on retrouve chez au moins quatre personnes en santé sur dix pour le *S. aureus*. La plupart du temps, ils vivent sans causer d'infection dans les fosses nasales ou autres endroits chauds et humides du corps (Henderson, 2006). *Staphylococcus aureus* est un organisme commensal qui peut aussi s'avérer être un pathogène dangereux causant des infections de la peau et des plaies, des endocardites, des ostéomyélites (infections des os), des pneumonies, des septicémies et le syndrome du choc toxique (Capparelli, 2007; Prescott, 1995). Le SARM ne cause pas nécessairement plus d'infections que les autres *Staphylococcus aureus*, mais il limite le choix de traitement efficace, dû à sa résistance à certains antibiotiques. Il se transmet principalement d'une personne à l'autre par contact direct avec une personne porteuse de la bactérie (colonisée), habituellement par les mains (McBryde et al., 2004). Le SARM peut rester dans les narines ou dans une plaie pendant plusieurs mois, parfois des années. Ces porteurs asymptomatiques peuvent donc l'être encore au moment d'une nouvelle admission à l'hôpital et représenter une source de transmission pour les autres patients exempts de la bactérie. De plus, il est à noter que l'association entre l'exposition aux antibiotiques et l'augmentation du risque d'isolement de SARM a été démontrée dans plusieurs études (Tacconelli et al., 2008)

À ce jour, le *Staphylococcus aureus* domine la liste des microorganismes responsables des infections nosocomiales. Au contact des antibiotiques, cette bactérie a acquis progressivement des résistances multiples aux antibiotiques, dont celle à la méthicilline, et ce, sans perdre sa virulence. Le SARM s'est disséminé progressivement dans la majorité des établissements de soins à l'échelle mondiale et la situation épidémiologique globale ne s'est pas améliorée au sein de la majorité des établissements qui en constituent un réservoir à long terme (Dancer et al., 2009). Au Canada, les premiers isolats ont été rapportés en 1981, mais ce n'est que depuis quelques années que l'incidence est plus marquée. En effet, une étude nationale réalisée dans le cadre du Programme de contrôle et surveillance des infections nosocomiales (PCSIN) révèle que l'incidence moyenne du SARM isolé dans les hôpitaux canadiens, est passée de 0,9% en 1995 à 10,4% en 2003. De façon générale, on estime que de 30% à 60% des patients hospitalisés et déjà colonisés par le SARM, présenteront une infection à cette bactérie. Les répercussions financières sont énormes pour les centres hospitaliers. On estime le coût annuel attribuable au traitement de 100 infections par le SARM à 1.5million/centre hospitalier (Rosner, 2004; INSPQ, 2006).

1.1.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* (PsA)

Ce sont des bactéries ubiquitaires vivant à l'état libre et opportunistes, c'est-à-dire qui peuvent être normalement présentes chez un individu en santé et qui deviennent pathogènes lors d'un affaiblissement des défenses de l'organisme. Il s'agit d'un petit bacille, Gram négatif, mobile grâce à son flagelle simple, largement répandu dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes,

les animaux et l'homme. Cette bactérie préfère les milieux humides et on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille externe et du tube digestif chez l'individu sain. Ce sont essentiellement les individus ayant reçu des antibiotiques, ceux affaiblis sur le plan immunitaire, ceux qui ont été hospitalisés ou encore les grands brûlés qui développent plus facilement une infection à *Pseudomonas* sp. Outre ces cas, le taux de portage (transmission du germe) est relativement faible (Ahmad, 2001; ASPC).

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont le plus souvent d'origine nosocomiale et elles représentent 11% des infections nosocomiales au Québec (ADVIN, 2008). Les sources d'infections mises en évidence sont les mains et les objets du personnel soignant, la ventilation, les désinfectants ou les produits de nettoyage contaminés, les éviers, les bains utilisés en physiothérapie, les endoscopes, les plantes vertes et les fleurs. *Pseudomonas aeruginosa* est susceptible d'entraîner les affections suivantes : pneumonie, septicémie, endocardite, infection du SNC, infections digestives, urinaires et de la peau (Merabishvili et al., 2009). De plus, cette bactérie présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et, au cours du temps, les souches ont acquis une résistance aux antibiotiques de première ligne (Cavallo et al., 2007).

1.1.5.3 *Acinetobacter baumannii* (Aci)

Acinetobacter baumannii est un bacille Gram négatif, aérobie, opportuniste, non-fermenteur, non mobile, encapsulé qui ne forme pas de spore (Patwardhan et al, 2008). Il est largement répandu dans l'eau et les sols, il croît

à différentes températures et pH et utilise de nombreux substrats pour croître. Il peut provoquer des bactériémies, des infections des voies respiratoires et des plaies chirurgicales. On note d'ailleurs une incidence accrue chez les soldats revenant de la guerre (infections des plaies), chez les patients aux soins intensifs et chez les malades chroniques (Montefour et al., 2008).

Les bactéries *Acinetobacter* sp. sont très répandues autour de nous. On en retrouve dans la flore cutanée de 25% des individus, dans le tube digestif et le pharynx. La présence de la bactérie dans ces localisations est habituellement sans conséquence pour l'individu. Le réservoir naturel est représenté par le malade infecté et les porteurs sains quiensemencent l'environnement, le lit du patient, ses meubles, etc. (MIDISS, 2007; Patwardhan et al, 2008). La transmission par les mains est habituelle. Ces bactéries peuvent rester longtemps dans le milieu extérieur et sont très résistantes, pouvant persister jusqu'à 4 mois sur des surfaces sèches et représenter un risque important de contamination environnementale (Wendt et al., 1997). Les épidémies peuvent être longues, le germe étant un des plus difficile à maîtriser.

En plus d'être persistante dans l'environnement, cette bactérie possède l'habilité à développer très rapidement une résistance multiple aux antimicrobiens. Les procédures invasives comme la pose de cathéters et l'emploi d'antimicrobiens à large spectre sont des facteurs de risque (Cisneros et Rodriguez-Bano, 2002). Le taux alarmant de résistance aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii*, principalement dans les services de réanimation, nécessite la mise en place d'une stratégie efficace de lutte contre l'infection nosocomiale.

1.1.5.4 *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV)

Les *Enterococcus* sp. sont des bactéries Gram positif, anaérobies facultatives, commensales du tractus intestinal et des voies génitales féminines; occasionnellement liées à l'infection des voies urinaires, à une bactériémie et à l'endocardite bactérienne.

Les entérocoques résistants à la vancomycine (appelés aussi ERV) sont des entérocoques qui ont développé une résistance à plusieurs antibiotiques dont la vancomycine (antibiotique de dernière génération). Les ERV ne sont pas plus virulents que les autres entérocoques, mais ils peuvent nécessiter une hospitalisation et un traitement plus difficile et plus long (MSSS, 2008). La plupart des infections nosocomiales qu'ils entraînent (10% des IN) sont dues aux souches *Enterococcus faecium* ou *Enterococcus faecalis* (Bonten et al., 2001).

Extrêmement robuste, l'ERV peut survivre pendant des semaines sur des surfaces, jusqu'à 77 jours dans le sol et jusqu'à 90 jours sur le linge souillé (ASPC). D'autre part, la période de colonisation peut se prolonger de 7 semaines à 3 ans représentant le réservoir le plus important d'ERV et une source de contamination environnementale constante (Tacconelli et al., 2008).

ERV semble rassembler les mêmes caractéristiques que les autres pathogènes nosocomiaux comme la colonisation intestinale persistante, la

colonisation de la peau (*S. aureus*) et la contamination de l'environnement (*A. baumannii*). Les surfaces environnementales et les patients colonisés ou infectés (peau) qui sont touchés fréquemment par le personnel hospitalier ont pu grandement contribuer à la dissémination rapide du ERV dans les hôpitaux (Bonten et al., 2001).

1.2 Persistance des bactéries sur les surfaces et désinfection de l'environnement hospitalier

1.2.1 Persistance des bactéries sur les surfaces

Même si le contact direct avec les patients représente la source majeure de transmission des pathogènes nosocomiaux, la contamination des surfaces environnementales peut également jouer un rôle important dans la transmission de certains pathogènes. Des preuves solides de transmission par l'environnement ont été établies pour *C. difficile*, SARM, ERV et *Acinetobacter baumannii* (Eckstein et al., 2007; Kramer et al., 2006 ; Dancer, 1999). En absence de désinfection régulière, les pathogènes nosocomiaux les plus communs peuvent survivre pendant des mois et ainsi représenter une source significative de transmission et de danger pour les patients et le personnel hospitalier. Il a été démontré que la plupart des bactéries Gram positif comme les *Enterococcus* sp. (ERV inclus), les *Staphylococcus aureus* (SARM inclus), *Streptococcus pyogenes* et certains bacilles Gram négatif

comme *Acinetobacter* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. ou *Shigella* sp. et les spores de *C. difficile* peuvent survivre des mois sur les surfaces (Tableau II). Aucune corrélation de persistance entre les souches sensibles et résistantes aux antibiotiques n'a cependant été relevée (Kramer et al., 2006).

Tableau II : Persistance des bactéries nosocomiales sur les surfaces

Type de bactérie	Durée
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 jours-7 mois
<i>Acinetobacter</i> sp	3 jours à 5 mois
<i>Clostridium difficile</i> (spores)	5 mois
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6h-16mois/ sur planchers 5 sem
<i>Enterococcus</i> sp	5 jours à 4 mois

(Adapté de Kramer et al., 2006)

1.2.2 La désinfection

Une étude de Wisplinghoff réalisée en 2007 évalue si la susceptibilité d'*Acinetobacter baumannii* aux désinfectants contribue à sa propagation dans les hôpitaux. Tous les désinfectants testés ont inhibé la croissance de tous les isolats bactériens mais des déviations mineures de concentrations ou de temps de contact, pouvant aussi se produire en pratique clinique, ont été montrées comme jouant un rôle important dans la transmission. De plus, il est aussi mentionné que la co-résistance aux antibiotiques et désinfectants contribuerait à la sélection des souches plus résistantes. Plusieurs microorganismes résistants

aux antibiotiques ont été rapportés comme étant moins susceptibles aux désinfectants; une association retrouvée surtout chez les Gram négatifs (*Proteus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) mais aussi chez le SARM et l'ERV (Carling et al., 2008). Malgré l'augmentation des précautions d'isolement et d'hygiène, ces résultats démontrent que d'autres stratégies devraient être envisagées.

Les désinfectants font partie intégrante de la prévention et l'éradication des infections nosocomiales. Actuellement, la lutte contre la propagation des infections nosocomiales en environnement hospitalier se fait principalement à l'aide d'agents chimiques. Ils sont répertoriés en cinq classes principales : phénolés, ammonium quaternaire, peroxyde d'hydrogène, produits chlorés et acides organiques. Chaque produit possède des caractéristiques désinfectantes et/ou nettoyantes qui lui sont propres. Le recours à ces produits chimiques peut causer plusieurs inconvénients importants, comme une toxicité chimique, le développement d'une résistance bactérienne et la détérioration des surfaces traitées. Dans certains cas, la détérioration se traduit par une augmentation de la porosité rendant la décontamination de plus en plus difficile. Cette détérioration nécessite également le remplacement plus fréquent du mobilier ou des instruments ce qui engendre un impact économique important. Ces produits posent un danger autant pour le personnel qui les utilise que pour les patients et l'environnement et requièrent des précautions de sécurité particulières. Plusieurs désinfectants de surface contiennent des composés d'ammonium quaternaires, phénoliques ou de l'hypochlorite de sodium qui peuvent causer l'irritation de la peau et de l'asthme. Aujourd'hui, les désinfectants sont un des principaux allergènes qui affectent le personnel hospitalier. De plus, un bon volume atteint les eaux usées pouvant affecter la qualité de l'eau dû à leur faible biodégradabilité (Dettenkofer et al., 2004).

1.2.3 Les bactériophages pour une décontamination sélective

Les bactériophages utilisés comme « désinfectants » spécifiques naturels, par leur action ciblée, pourraient réduire significativement la transmission des infections nosocomiales tout en limitant l'impact sur les surfaces de travail, les instruments ainsi que sur les patients et le personnel hospitalier. L'utilisation de produits naturels tels que les bactériophages serait une alternative intéressante pour la prévention et le contrôle des infections nosocomiales. En plus de permettre le développement d'un volet préventif, ces produits écologiques à base de phages gagneraient à être développés comme agents thérapeutiques en alternative et/ou en supplément aux antibiotiques, couvrant ainsi les différents stades de développement d'une infection bactérienne spécifique.

1.3 Les bactériophages

1.3.1 Définition

Les bactériophages, communément appelés phages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries. Ils représentent l'entité vivante la plus importante sur terre; on en compte entre 10^{30} et 10^{32} . Ubiquitaires dans notre monde (océans, sols, eau potable, nourriture, etc.) et retrouvés partout où vivent leur hôte, les bactéries (eaux usées, selles, sols), ils ont même déjà été isolés de

vaccins commerciaux disponibles aux États-Unis. Ce sont des commensaux normaux de l'humain que l'on retrouve fréquemment dans le tractus gastro-intestinal, sur la peau, dans l'urine et la bouche. Ce sont les prédateurs naturels des bactéries. Les bactériophages jouent donc un rôle primordial dans la balance microbienne de tous les écosystèmes (Kutter et al., 2005).

Les bactériophages reconnaissent à la surface de la bactérie des récepteurs spécifiques auxquels ils se lient puis insèrent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. Comme les autres virus, leur matériel génétique peut être sous forme d'ARN ou d'ADN simple ou double brins. Suite à l'attachement sur la bactérie et l'injection de leur matériel génomique dans celle-ci, les phages utilisent le métabolisme de la bactérie pour synthétiser leurs composantes virales. La nouvelle génération de bactériophages est assemblée dans la bactérie, libérée dans le micro-environnement, se liera et tuera les bactéries de l'espèce reconnue présente dans cet environnement et le cycle recommence. Pour une bactérie type, chaque cycle de reproduction dure environ 30 minutes et produit de 50 à 100 nouveaux bactériophages (Resh et Meyer, 2002; Kutter et al., 2005).

Il existe deux types de phages : les phages lytiques et les phages tempérés. Les phages lytiques se répliquent comme décrit précédemment. Quant aux phages tempérés, ils peuvent incorporer leur génome à celui de la bactérie en demeurant dans un état quiescent appelé prophage pendant plusieurs cycles de la réplication bactérienne. Suite à un signal, le génome du phage sera excisé de celui de la bactérie pour entamer un cycle lytique. L'excision du génome du phage n'étant pas toujours précise, le phage peut emporter un bout de génome bactérien (pouvant être des gènes de toxine ou de résistance) et le

transférer à une nouvelle bactérie, induisant un transfert génétique d'une bactérie à une autre.

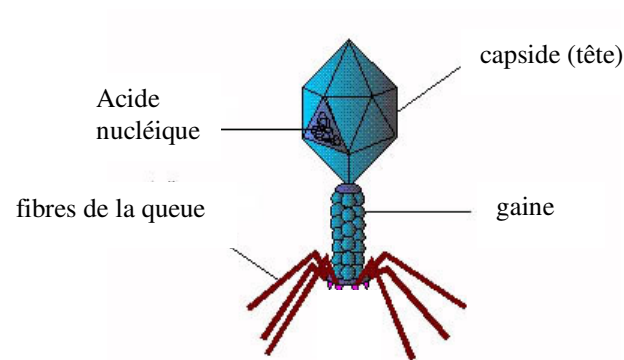
Les bactériophages, comme tous les virus, sont des parasites absolus. Même s'ils possèdent toute l'information pour diriger leur reproduction dans un hôte spécifique, ils n'ont pas de machinerie pour générer de l'énergie, ni de ribosomes pour produire des protéines. Leur multiplication dépend donc entièrement de la présence de leur hôte bactérien (Kutter et al., 2005).

1.3.2 Structure

Comme les virus qui infectent les eucaryotes, les phages sont constitués d'une enveloppe protéique externe, la capsid, qui protège le matériel génétique (ADN ou ARN). On dénombre 21 morphologies différentes chez les virus bactériens actuellement reconnus par l'ICTV (« International Committee on Taxonomy of Viruses »), l'organisme responsable de la taxonomie des virus. En 2000, plus de 5 000 bactériophages différents avaient été observés et décrits. Plus de 95 % d'entre eux possédaient une queue impliquée dans l'entrée de l'ADN du phage dans la bactérie et appartenaient à l'ordre des *Caudovirales* (phages d'ADN double brins de 5 à 650 kpb à queue avec une capsid de 24 à 200 nm). Tous les phages possèdent une capsid qui peut varier en taille et en forme. Certaines sont icosaédrales (20 faces), d'autres sont filamenteuses.

Cependant, ce ne sont pas tous les phages qui possèdent une queue attachée à leur capsid, permettant le passage de l'acide nucléique durant l'infection. La taille de la queue est variable selon les familles et peut être entourée d'une gaine de myéline comme le phage T4 (figure 2). Certains phages possèdent aussi des structures terminales d'adsorption à la cellule bactérienne (crampons, fibres). (<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>; Kutter et al., 2005).

Figure 2 : Structure du phage T4



(traduit de <http://biology.about.com/od/virology/a/aa11108a.htm>)

1.3.3 Historique

Les bactériophages ont été découverts indépendamment par le bactériologiste anglais Frederick Twort en 1915 et par le biologiste canadien Félix d'Hérelle en 1917 qui les baptisa « bactériophages ». La première application des phages pour traiter des maladies infectieuses remonte à 1921

par Bruynogue et Maisin qui les ont utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *Staphylococcus* sp. Ils ont aussi été utilisés pour traiter la dysenterie, le choléra et la fièvre typhoïde. Dans les années 1930, plusieurs produits à base de phages qui ont été commercialisés aux États-Unis ont reçu des rapports positifs sur leur efficacité, particulièrement pour les infections dues aux *Staphylococcus* sp. et les maladies intestinales. En Georgie, où les phages sont étudiés depuis 1934, des chercheurs ont rapporté que la thérapie phagique avait un taux de succès de 80% contre les infections d'entérocoques. En Pologne, les médecins ont eu un taux de succès de 90% contre des cas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Pirisi, 2000).

Cependant, l'enthousiasme de départ pour les bactériophages a vite été remplacé par un scepticisme critique suite à des rapports négatifs sur l'inactivité de certaines préparations commerciales ainsi que la mort de patients traités (Kutter et al., 2005; Duckworth et al., 2002). Les résultats mitigés de la thérapie phagique, l'usage inapproprié des phages, le manque de connaissances sur la nature des bactériophages, le manque de standards de pureté et les études incontrôlées ont fait, qu'avec la découverte des antibiotiques et l'éclatement de la deuxième guerre mondiale, la phagothérapie a été abandonnée dans les pays occidentaux. Toutefois, les phages ont toujours continué à être utilisés comme agents thérapeutiques avec succès en Europe de l'Est et dans l'ex-Union soviétique. Aujourd'hui, le taux alarmant de bactéries résistantes aux antibiotiques, combiné au fait que les nouvelles classes d'antibiotiques pour les affronter se font plus rares, nous obligent à nous tourner vers d'autres alternatives, d'où un regain d'intérêt pour les bactériophages (Sulakvelidze et al., 2001). De nos jours, la technologie biomédicale est bien différente de ce qu'elle était aux premiers temps de la recherche sur la thérapie phagique. Nos

connaissances sur les propriétés biologiques des phages et les mécanismes régissant l'interaction phage-bactérie se sont grandement élargies. Ces avancées peuvent maintenant permettre le développement de préparations de phages thérapeutiques sécuritaires ayant une efficacité optimale envers leurs hôtes bactériens spécifiques afin d'intégrer la thérapie phagique à nos méthodes de prévention et de traitement des infections bactériennes.

1.3.4 Avantages

L'utilisation des phages comme agents de lutte contre les infections nosocomiales présente de nombreux avantages par rapport aux antibiotiques. Les phages sont déjà présents et actifs dans la nature, ils sont donc relativement faciles à isoler, leur production est simple, rapide et peu coûteuse. De plus, ils possèdent la capacité d'évoluer en s'adaptant aux bactéries qu'ils infectent, c'est-à-dire qu'en présence de bactéries résistantes au phage, il est toujours possible d'isoler un autre phage mutant qui sera efficace ou encore d'adapter le phage disponible à la souche résistante (culture prolongée du phage avec la bactérie) (Barrow et Soothill, 1997). Les mutations qui causent la résistance bactérienne aux antibiotiques sont différentes de celles qui causent la résistance phagique car chaque traitement agit à différents niveaux de la bactérie (Pirisi, 2000). Les phages peuvent toujours évoluer naturellement en s'adaptant aux mécanismes de résistance des bactéries. Il est important de mentionner que le taux de développement de résistance aux phages est dix fois plus faible que celui aux antibiotiques (Sulakvelidze et al., 2001). De plus, l'utilisation d'un cocktail de phages avec différents récepteurs/spécificité permet de limiter encore plus l'apparition de résistance.

La haute spécificité des phages envers une espèce et parfois même un genre, évite la destruction non spécifique des bactéries de la flore normale des patients. Ainsi, l'équilibre de l'organisme est maintenu sans risque d'infections secondaires opportunistes ou de diarrhées qui sont des effets secondaires fréquents avec l'emploi d'antibiotiques à large spectre. Comme ils n'infectent que les bactéries et non les cellules des organismes pluricellulaires, ils sont sans danger pour l'homme, les animaux ou les plantes.

Un autre avantage intéressant est leur capacité de croissance exponentielle rapide directement au site d'infection en suivant la croissance de leur hôte bactérien jusqu'à sa disparition. Il y a donc une persistance à long terme du traitement. Ce qui signifie qu'une seule dose de phage pourrait traiter une infection, limitant l'administration de plusieurs doses pendant la durée du traitement et que lorsqu'un cocktail de phages serait administré, seulement les phages pertinents se multiplieraient (Barrow et Soothill, 1997). Les traitements phagiques représentent donc un des rares traitements multiplicatifs, sinon le seul.

1.3.5 Limites

Le spectre d'hôte très étroit des bactériophages leur confère un avantage de taille face aux antibiotiques mais peut aussi être considéré comme un inconvénient. Cette haute spécificité entraîne la nécessité d'avoir une large banque de phages disponibles bien caractérisés et des méthodes pour

déterminer rapidement quel phage serait efficace contre l'infection (Merrill et al., 2003).

Même si aucun effet secondaire dommageable n'a été rapporté avec l'utilisation des phages, la pureté de la préparation reste un critère très important. Les phages étant relâchés à partir des bactéries lysées, les préparations brutes peuvent contenir des lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan ou autre composant toxique pouvant causer un choc septique. Cependant, les phages peuvent être facilement purifiés par différentes techniques comme la centrifugation haute vitesse ou la chromatographie qui permettent d'éliminer les impuretés et de rendre les préparations de phages non toxiques.

Le transfert horizontal d'ADN entre souches bactériennes peut être effectué par des bactériophages et constitue un problème potentiel pour leur usage thérapeutique. Ainsi, des gènes de virulence ou de résistance à différents antibiotiques peuvent être disséminés par transduction par des phages (Resch et Meyer, 2002). Cette capacité de transduction peut être testée en laboratoire pour éviter ce problème avant toute thérapie (Duckworth et Gulig, 2002). Cette fonction est liée aux phages tempérés d'où la sélection de phages lytiques pour la thérapie phagique ou désinfection.

Du côté immunologique, les phages étant antigéniques, peuvent être éliminés rapidement du corps par le système réticulo-endothélial (Kropinski, 2006). Une étude menée par Merrill en 1996, a permis le développement d'une

méthode de « passages sériels » pour isoler des phages aptes à persister dans la circulation (Merril, 1996; Pirisi, 2000). Même s'il est possible qu'une réponse immunitaire générée par l'exposition au phage le neutralise, il est important de mentionner que la thérapie phagique est habituellement complétée avant même le début d'une immunité spécifique. Toutefois, une utilisation subséquente de la même préparation pourrait s'avérer inefficace par la présence d'anticorps (Duckworth et Gulig, 2002).

L'isolement des phages comme agents thérapeutiques doit se limiter aux phages lytiques car en plus de leur potentialité à transmettre des gènes (de virulence) d'une bactérie à l'autre, la période de latence des phages tempérés ne permet pas une thérapie rapide et contrôlée, et ils ne détruisent pas 100% de la bactérie infectée (Kropinski, 2006). Le séquençage du génome des phages potentiellement utilisables en thérapie est donc essentiel pour s'assurer que le génome ne renferme pas de gène de virulence ou de résistance (Duckworth et Gulig, 2002).

1.3.6 La thérapie phagique

Le regain d'intérêt pour la thérapie phagique a débuté dans les années 1980 quand six études polonaises menées par Steven Slopek sur 550 patients ont été traduites en anglais. Les infections traitées étaient causées par *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp. ou *Salmonella* sp. Les phages utilisés en traitement avaient préalablement été testés pour induire la lyse complète des souches isolées des patients. Leur administration s'est faite soit oralement ou localement

dépendamment du type d'infection. Aucun effet adverse n'a été rencontré et le taux de succès global a atteint 92%, mesuré selon l'amélioration de l'état de santé, le traitement des blessures et la disparition de la bactérie infectante. Cependant, cette étude ne comportait pas de contrôle ni de compte de bactérie ou de phage avant et après traitement. Elle suggère tout de même que la thérapie phagique peut avoir un rôle utile dans le traitement des maladies infectieuses et mérite des études plus contrôlées (Sulakvelidze et al., 2001 ; Duckworth et Gulig, 2002).

Afin d'étudier la thérapie phagique avec rigueur, plusieurs groupes de recherche se sont tournés vers l'expérimentation animale. L'équipe de Smith et Huggins (1982) a traité des souris atteintes de septicémie et de méningite, suite à l'inoculation intramusculaire ou intracérébrale avec *E.coli* K1 puis les a traitées par un traitement phagique ou antibiotique. Le traitement phagique (une dose) a empêché la mort des souris, causé une réduction rapide du nombre de bactéries dans tous les tissus examinés (muscle, rate, foie, cerveau et sang) et a été plus efficace que plusieurs doses d'antibiotiques. Soothill (1992) a examiné des phages spécifiques à *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* pour protéger des souris par inoculation parentérale de ces bactéries qui infectent les plaies des brûlés. Il est apparu qu'aussi peu que 10^2 ufp (unité formant une plage de lyse) de phage spécifique à *A. baumannii* pouvait protéger les souris contre une infection létale de 10^7 à 10^8 ufc (unité formant une colonie), tandis que 10^7 à 10^8 ufp étaient requis pour protéger les souris contre 10^8 ufc de *P. aeruginosa* (Duckworth et Gulig, 2002).

Une étude américaine a démontré que des souris infectées par 10^9 ufc d'ERV (intrapéritonéal) pouvaient être sauvées à 100% d'une bactériémie

fatale par l'injection 45min après infection de 10^8 ufp d'un phage lytique à large spectre contre les ERV (Biswas et al., 2002).

Une autre équipe américaine a utilisé des souris avec des brûlures infectées et leur a administré une dose d'un mélange de trois phages contre *Pseudomonas aeruginosa* par voie intramusculaire, sous cutanée ou intrapéritonéale. Les résultats de cette étude indiquent qu'une seule dose de phages peut améliorer significativement le taux de survie des souris infectées : de 6% de survie sans traitement, le taux passe à 87% avec le traitement phagique administré par voie intrapéritonéale (McVay et al., 2007).

Plusieurs études portent sur la thérapie phagique contre *Staphylococcus aureus* incluant le SARM. Capparelli et son équipe ont inoculé simultanément 10^8 ufc à des souris et 10^9 ufp de phage anti-staphylococcique avec un taux de succès de 97%. De plus, le phage a pu prévenir la formation d'abcès et réduire la charge bactérienne ainsi que le poids des abcès (Capparelli et al., 2007). Dans une autre étude réalisée au Japon, l'effet protecteur des bactériophages a été testé sur des souris infectées par *S. aureus*. Une injection intrapéritonéale de 8×10^8 cellules de *S. aureus* entraîne une bactériémie et la mort éventuelle des souris. Une injection subséquente de phages purifiés supprime la létalité induite par *S. aureus* et coïncide avec l'apparition du phage dans la circulation qui reste présent jusqu'à l'éradication de la bactérie sans effets secondaires (Matsuzaki et al., 2003). Wills a aussi testé l'effet protecteur d'un bactériophage contre *S. aureus* chez le lapin avec une plaie infectée. Il s'est avéré que 2×10^9 ufp de phages empêche la formation d'abcès lorsque injecté simultanément à 8×10^7 ufc dans le même site sous-cutané (Wills et al., 2005). Dans une étude irlandaise, le phage K, un phage à large spectre anti-

staphylococcique, a été utilisé pour le nettoyage des mains et a entraîné une réduction du taux de SARM sur la peau humaine de 100 fois. Le même phage mélangé à une crème à main à base de bismuth a présenté une activité antibactérienne après 4h, et ce, pour plusieurs jours *in vitro*. Cette approche semble encourageante pour diminuer la transmission du SARM par les mains dans les hôpitaux (O'Flaherty et al., 2005).

Du côté environnemental, une étude réalisée par la compagnie Intralytix, aux États-Unis, démontre que l'application d'un mélange de phages pendant 5 min sur une surface ou des aliments contaminés avec *E.coli* O157:H7 entraîne une réduction bactérienne moyenne de 97% (Abuladze et al., 2008). Dans une autre étude réalisée au Royaume-Uni, les bactériophages ont été utilisés avec succès afin de réduire la colonisation par *Campylobacter jejuni* chez le poulet. Les résultats démontrent que différentes doses de phages administrés oralement dans une suspension antiacide, entraînent une chute des comptes bactériens de 0,5 à 5 log₁₀ ufc/g comparativement aux contrôles non traités (Carrillo et al., 2005).

En août 2006, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé l'utilisation d'un additif alimentaire antimicrobien constitué d'un mélange de six bactériophages utilisé pour détruire *Listeria monocytogenes* sur les produits de la volaille prêts à la consommation (Alain, 2006).

L'ensemble de tous ces résultats démontre bien le potentiel de la thérapie phagique pour sauver des animaux infectés (et par extension les êtres humains) avec des souches de bactéries résistantes aux antibiotiques. Les taux

de succès sont la plupart du temps entre 80 et 90%. La thérapie par les phages peut être très efficace dans certaines conditions autant en prévention qu'en traitement et possède des avantages uniques par rapport aux antibiotiques.

1.4 Problématique et Objectifs

Le potentiel prometteur de la thérapie phagique en alternative et/ou complément aux antibiotiques a souvent, par le passé, été éclipsé par l'inefficacité de certaines préparations de bactériophages et ce, dû notamment à l'utilisation de phages très peu caractérisés. Avec l'augmentation de l'incidence des bactéries résistantes et persistantes, combiné au déficit de développement de nouvelles classes d'antibiotiques pour leur faire face, l'urgence se fait sentir pour développer des préparations thérapeutiques de phages bien caractérisés, efficaces et sécuritaires.

L'isolement de phages spécifiques aux bactéries nosocomiales et leur caractérisation détaillée permettra de démontrer qu'ils offrent une alternative antibactérienne naturelle face aux infections nosocomiales.

Afin d'obtenir des phages capables de tuer les bactéries nosocomiales, en tant que désinfectant ou agent thérapeutique, les étapes suivantes sont nécessaires pour assurer la sécurité et l'efficacité des phages choisis :

- 1- Isoler des phages spécifiques aux bactéries nosocomiales ciblées : SARM, ERV, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*.
- 2- Caractériser les phages isolés au niveau génomique et biologique et sélectionner les meilleurs.
- 3- Démontrer l'efficacité des phages sélectionnés *in vitro*.
- 4- Tester les phages efficaces *in vitro* en environnement contrôlé et hospitalier

2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées, incubés avec la bactérie cible pour être ensuite sélectionnés selon leur capacité d'amplification, leur profil génomique par des enzymes de restriction et leur profil de spécificité (Figure 3). Les meilleurs candidats sont caractérisés pour établir leurs caractéristiques d'infection, leur spectre lytique complet, leur pureté, leur profil génomique précis, leurs caractéristiques morphologiques, leur stabilité à différentes températures ainsi que leur efficacité *in vitro* (Figure 4). La plupart des méthodes décrites dans cette section ont été élaborées chez Biophage Pharma.

Figure 3 : Processus de sélection d'un bactériophage

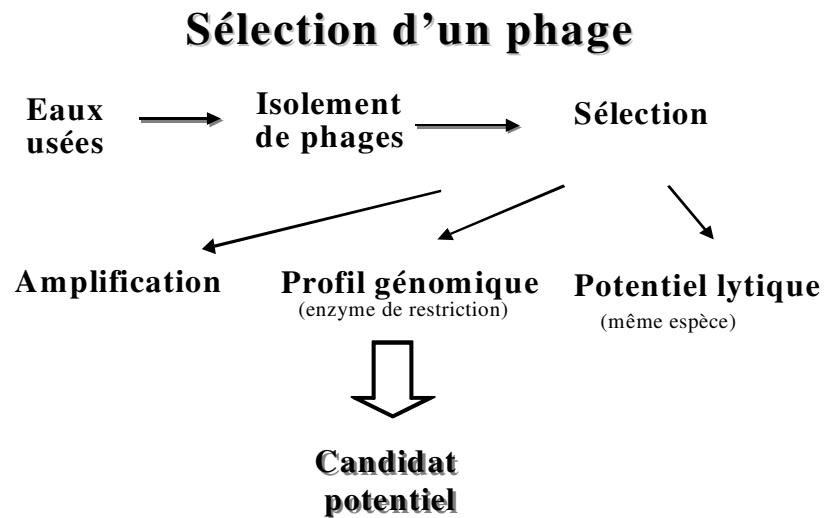
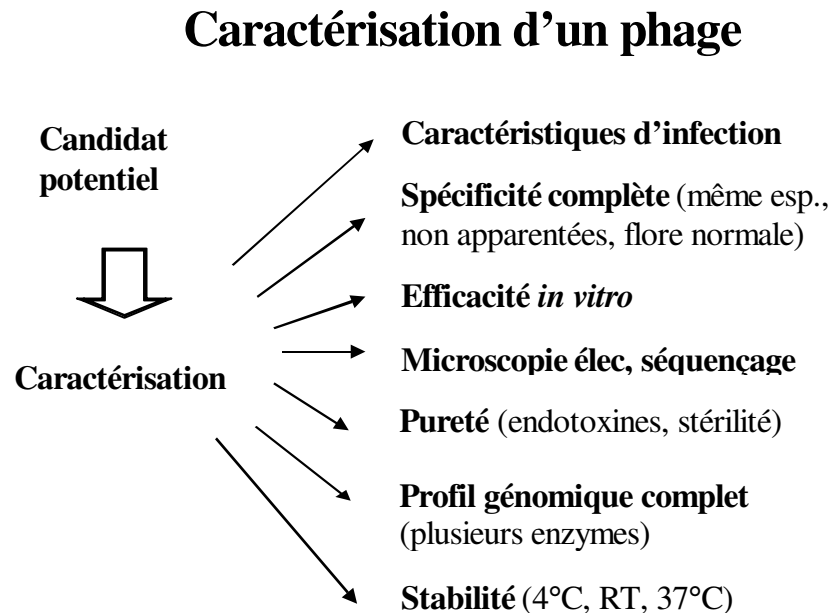


Figure 4 : Processus de caractérisation d'un bactériophage



2.1 Cultures bactériennes

Les bactéries ciblées dans le cadre du projet sont *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) et *Acinetobacter baumannii* (Aci). Toutes les souches cliniques utilisées ont été isolées de spécimens cliniques à partir de patients de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Les autres souches sont issues de la banque de Biophage Pharma et ont été acquises, pour la plupart, de la banque Félix d'Hérelle (Université Laval, Québec). Toutes les souches bactériennes sont cultivées à 37°C dans le milieu de culture Luria-Bertani (LB) (Quélab, Montréal, Canada). Le milieu solide

(pétris) renferme 1,5% d'agar bactériologique (Quélab). Toutes les souches sont stockées dans du milieu LB contenant 20% de glycérol à -80°C.

2.2 Titration des phages

Pour connaître la concentration d'un phage, un tapis bactérien doit d'abord être étalé sur pétri LB. Pour ce faire, 100 µl de la culture bactérienne hôte du phage en phase stationnaire sont ajoutés à 2,5 ml de milieu LB semi-solide (0,7% agar) qui sont coulés sur pétri contenant une gélose de milieu LB. Après solidification du tapis bactérien, 10 µl de phages dilués en série sont déposés sur le tapis bactérien. Une fois les gouttes séchées, le pétri est incubé toute la nuit à 37°C. Le lendemain, les plages de lyse sont comptées et la concentration du phage est calculée comme suit :

$$\text{Nombre de plage de lyse} \times \text{dilution} \times 100 = \text{ufp/ ml}$$

(Adams, 1959)

2.3 Isolement des bactériophages

Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées de la station d'épuration de la ville de Montréal. Pour l'isolement de phages, 10 ml d'échantillon sont d'abord mis en contact avec la bactérie cible (500µl) dans 10 ml de milieu LB à 37°C toute la nuit. L'échantillon amplifié est ensuite centrifugé 30 min à 2500 g (Sorvall RT7), le surnageant est filtré (Millipore

0,22 $\mu\text{m-GP}$) et 100 μl sont étalés sur un tapis bactérien de la bactérie cible. Les pétris sont incubés à 37°C toute la nuit. En présence de lyse bactérienne, trois étapes de piquage doivent être effectuées sur les plages de lyse afin d'assurer l'obtention d'un seul phage isolé. Le processus d'isolement peut prendre entre une et deux semaines.

2.4 Amplification des phages

Les bactériophages isolés sont amplifiés à 37°C dans du milieu LB (20-25 ml) en utilisant un ratio d'environ 1 phage pour 100 bactéries (MOI = 0,01) afin d'analyser leur capacité d'amplification. Suite à une incubation de 6h et/ou 24h, le mélange est centrifugé (Sorvall RT7, 3500 rpm), filtré (Millipore 0,22 $\mu\text{m-GF}$) et les concentrations en phages actifs sont évaluées par titration sur tapis bactérien. Pour obtenir un volume plus important (250 ml), les mêmes étapes sont suivies en utilisant le meilleur temps d'incubation et le meilleur ratio si différents MOI ont été testés.

Lorsque le phage est amplifié à un titre supérieur ou égal à 10^8 ufp/ml, une partie est utilisée pour faire les stocks à 4°C telle quelle en milieu LB, à -80°C (glycérol 50%) et le reste servira pour les extractions d'ADN.

2.5 Analyse du génome des phages

L'extraction de l'ADN ou l'ARN génomique des phages isolés se fait par précipitation au polyéthylène glycol et nécessite 5 ml d'amplification. L'ADN et l'ARN bactérien sont éliminés en ajoutant 1 µl de RNase (Boehringer) et 1 µl de DNase (Amersham) aux 5 ml de phages en les incubant à 37°C pour 30 minutes. Un volume de 5 ml de PEG-NaCl 2X (PEG-8000 20%, NaCl 2M) est ensuite ajouté et le mélange est mis sur glace pour au moins 1h30. Après une centrifugation de 15 min à 12 000 g (Beckman, rotor JA-25.50) qui permet de précipiter le complexe phage-PEG, le surnageant est retiré et le culot resuspendu dans 500 µl de TMN (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM). Le PEG est éliminé par du chloroforme pendant que le phage est encore intact puis les phages sont détruits par du phénol et l'élimination des protéines phagiques se fait par l'ajout de phénol/chloroforme. Pour ce faire, un volume de 500 µl de chloroforme est ajouté au tube de phage précipité qui est mélangé par inversion, centrifugé 2 min (Microfuge Heraeus, 13 000 rpm) et la phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube. Cette série d'étapes est répétée 3 fois avec du phénol, du phénol:chloroforme:alcool isoamyle (25:24:1) et du chloroforme:alcool isoamyle (24:1). Pour précipiter l'ADN du phage, 1/10 du volume (environ 50 µl) d'acétate de sodium 3M (pH 5.2) est ajouté et mélangé, puis 1 ml d'éthanol glacé 100% est ajouté et le tube est mélangé par inversion. Après 10 min d'incubation sur la glace, le tube est centrifugé 10 min (Microfuge Heraeus, 13 000 rpm), le surnageant est retiré, le culot séché à l'air pour être resuspendu dans 25 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, 200 µl EDTA pH 8.0 1 mM).

L'ADN est quantifié en le diluant au 1/50 pour évaluer la densité optique à 260 et 280 nm. L'analyse du profil génomique se fait par digestion de 0,5 µg d'ADN avec des enzymes de restriction (ex. : HaeII) et analyse sur un gel d'agarose 1% afin de comparer les profils génomiques des phages entre eux et de les classer (adapté de Janssen, 1995). Lorsque la digestion par des enzymes de restriction n'est pas concluante, la digestion est effectuée de la même manière avec la DNase et la RNase pour déterminer la nature du génome du phage.

Pour établir le profil complet du génome des phages, l'ADN est extrait, quantifié et analysé par FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) pour déterminer la taille du génome puis digéré par différentes enzymes de restriction (EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, Sall et HaeII) afin d'établir le profil de digestion complet du phage.

2.6 Spécificité des phages

Le test de spécificité consiste à déposer plusieurs concentrations de phages (10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 ufp/ml), sur un tapis bactérien des souches à tester et évaluer le niveau de lyse.

Il faut noter que ce test de spécificité sur pétris détecte la lyse et ne peut pas détecter un phage qui s'attache à une bactérie sans la lyser. Pour ce faire, il faut amplifier le phage en utilisant son hôte et différentes souches : l'amplification croisée (même principe que l'amplification décrite

précédemment dans la section 2.4). Une absence d'amplification signifie que le phage est stable en présence de la bactérie testée et donc n'interagit pas avec celle-ci. Si l'amplification est négative, c'est-à-dire un titre d'au moins un log de moins que le phage sans bactérie (contrôle), le phage est retenu par la bactérie sans s'amplifier et une amplification positive (titre d'au moins un log de plus que le phage seul) reflète une amplification en présence de la bactérie testée. Ces deux techniques combinées permettent d'établir un profil de spécificité précis.

2.7 Cinétique d'adsorption

Pour déterminer le taux d'entrée d'un phage dans sa bactérie hôte, une forte concentration de phages (10^9 ufp/ml) est mise en contact avec une forte concentration de bactéries (ratio 1 :1) dans une seringue pour être filtrée (Millipore, 0,22 μ m-GF) à différents temps de contact à température pièce (en changeant le filtre à chaque fois). La concentration de phages dans le filtrat est évaluée par titration sur tapis bactérien.

2.8 Cinétique de réplication

Le phage est amplifié tel que décrit précédemment, en utilisant différents ratios de phage/bactérie à 37°C et à température de la pièce afin de déterminer ses conditions optimales d'amplification. Le phage est titré à

chaque heure pendant 10 à 12h et 24h pour établir à quel moment l'amplification est maximale.

2.9 Purification

Deux méthodes de purification ont été testées : la centrifugation et la filtration tangentielle.

Centrifugation :

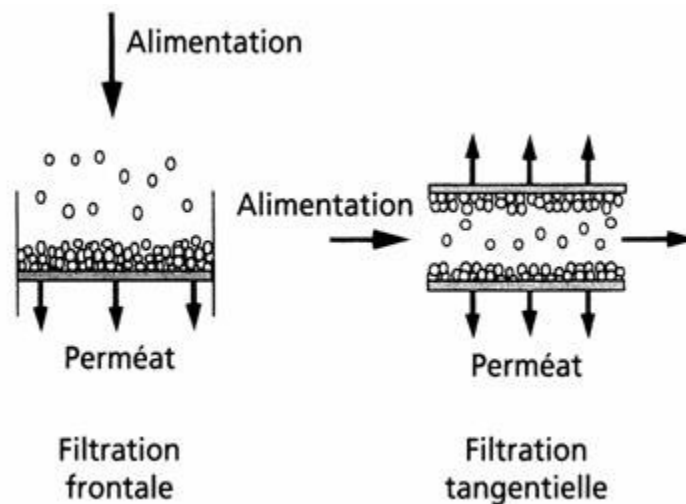
Afin de déterminer quelles sont les meilleures conditions de purification des phages en terme de pureté et de pourcentage de récupération, une préparation de 20 à 25 ml de phages est centrifugée à différentes vitesses soient, 8000, 12 000, 15 000 et 48 000 g pendant 1h (Beckman, Avanti-J25). Le surnageant est retiré, le culot resuspendu dans un tampon (par exemple le SM), filtré (Millipore 0,22 μm -GF) et la concentration de chaque culot et surnageant est évaluée par titration sur tapis bactérien et comparée à la préparation initiale.

Filtration tangentielle (TFF):

La filtration tangentielle est un procédé mécanique de séparation en phase liquide basé sur les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse balayée tangentiellement par le liquide contenant les constituants à séparer. La pression du fluide lui permet de traverser le filtre. Ainsi, les particules restent dans le flux de circulation tangentiell, et le colmatage

s'effectue beaucoup plus lentement que lors d'une filtration simple. Après le passage à travers la membrane, on obtient deux fractions liquides : le perméat, ou filtrat qui contient les molécules ayant un diamètre inférieur au diamètre des pores de la membrane et le rétentat qui est enrichi par rapport au liquide initial en molécules et particules ayant un diamètre supérieur au diamètre des pores de la membrane. L'augmentation de la concentration de ces molécules et particules est directement liée à la quantité de perméat produite (Figure 5) (Protocole du fabricant).

Figure 5: Écoulements comparés de fluides en filtrations frontale et tangentielle



<http://www.u-bourgogne.fr/GPMA/Enseign/tphall2007/TPFiltration2007.htm>

Pour la filtration tangentielle des phages, nous avons utilisé le système KrosFlo (Spectrum Labs) muni d'une membrane de 100 kDa. Pour la recirculation du perméat, le tampon TMN (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM, NaCl 100 mM) est utilisé graduellement pour rincer la colonne et récupérer le

rétentat final concentré. Ce dernier est filtré (Millipore 0,22 μm -GF) et la concentration de chaque fraction est évaluée par titration sur tapis bactérien afin d'évaluer le pourcentage de concentration des phages.

2.10 Stabilité des phages

La stabilité des phages est évaluée en les normalisant à une concentration de 10^8 ufp/ml dans le tampon SM et le milieu de culture LB, en les incubant à 4°C et à température ambiante pour une durée de 2 ans ou jusqu'à ce que la préparation soit instable. La stabilité à 37°C est vérifiée pendant une période de 2 semaines. La concentration des préparations est évaluée par titration en duplicata tous les mois. Lorsque le ratio (titre / titre initial) est plus petit que 0,2 deux fois consécutives, la préparation est considérée instable.

2.11 Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission du phage BP14 a été réalisée à l'Institut Armand-Frappier par le Dr Robert Alain. Des photos ont été prises pour une préparation en LB non centrifugée et une préparation purifiée resuspendue dans du tampon SM à une concentration de 10^9 ufp/ml après coloration négative et une centrifugation de 5 min à 120 000 g.

2.12 Susceptibilité aux désinfectants

La sensibilité des phages envers différents désinfectants, notamment ceux utilisés en hôpital, est testée en présence de matériel organique (sérum foetal bovin). Pour ce faire, le phage est dilué à 10^8 ufp/ml pour être mis en contact avec le désinfectant dilué à la concentration recommandée par le fabricant et 5% de FBS (foetal bovine serum). La concentration du phage est évaluée par titration en arrêtant la réaction en diluant l'échantillon 1 :100 à 5, 15 et 30 minutes de réaction.

2.13 Sécurité

La pureté est évaluée par le dénombrement des endotoxines pour les phages de bactéries Gram négatif et idéalement le séquençage complet du génome du phage. De plus, pour s'assurer que le phage est sécuritaire, il est testé envers différentes souches non pathogènes pour s'assurer de sa non-interaction avec des bactéries de la flore normale tel que décrit dans la section « 2.6 Spécificité ».

Test d'endotoxines :

Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe des bactéries Gram négatif. Elles peuvent être libérées lors de la lyse bactérienne et causer un choc septique. Pour la détection des endotoxines, le kit Pyrotell Gel-clot (LAL test) est utilisé. Le *Limulus*

amebocyte lysate (LAL) est un extrait aqueux de cellules sanguines (amoebocytes) provenant du crabe *Limulus polyphemus*. Le LAL réagit avec l'endotoxine bactérienne ou LPS en produisant un gel à 37°C. Le dosage des endotoxines est fait suite à une série de dilutions de l'échantillon ainsi que d'un contrôle positif utilisé pour déterminer la sensibilité du test.

Séquençage :

Le séquençage du phage BP14 a été réalisé par Génome Québec sur une quantité de 5 µg d'ADN.

Contamination bactérienne :

Pour s'assurer que la préparation de phage est exempte de bactéries, 500 µl sont déposés sur un pétri LB incubé 72 h à 37°C avec et sans amplification préliminaire de 72 h en LB. La présence de colonie bactérienne est vérifiée chaque jour et des passages sont effectués aux 3 jours par une suspension en milieu LB, et ce, pour une période de deux semaines et demie.

2.14 Efficacité *in vitro*

Pour vérifier la capacité d'un phage à éliminer ou diminuer la quantité d'une bactérie, l'efficacité d'un phage testée *in vitro* est un bon indicateur. Il s'agit d'une amplification à 37°C et/ou à température ambiante au cours de laquelle la densité optique à 600 nm et la concentration des phages sont évaluées à chaque heure afin de vérifier la capacité du phage à diminuer le nombre de bactéries viables dans le temps.

3 RÉSULTATS

3.1 Isolement des bactériophages

L'isolement des phages a été réalisé sur des échantillons des eaux des égouts de la station d'épuration de la Ville de Montréal en utilisant les isolats de bactéries de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

Tableau III: Nombre d'isolats de phages obtenus par bactéries

Essai Bacterie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
SaA4		-	1	2	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SaA5	1	1	-	1	3	-	1	2	3	-	1	-			1	1	1	3
SaA19													-	-	-			
SaA24													-	-	-			
Ensp1			1		-		-				1	-			-			
Ensp2			3	-					1	-			-	-	2			
ERV3			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-
Ensp4																1	3	
Ensp6																1	3	
PsA1		3	3	4		4	3											
PsA6		4																
PsA24			3	3	4		2				3							
PsA25			3		1	-	-											
Aci1																-		
Aci2																2	-	
Aci3																3	3	3
Aci4																-		

Le tableau III, nous montre que l'isolement de bactériophages est très aléatoire. Les phages ne sont pas trouvés dans tous les échantillons et ils ne sont pas toujours isolés à partir des mêmes bactéries hôtes. Il y a même certaines souches de bactéries nosocomiales pour lesquelles aucun phage n'a été isolé après 18 essais (ERV3). Par opposition, l'isolement de phages *Pseudomonas aeruginosa* a été beaucoup plus facile. Mentionnons aussi que la « pêche » aux phages a été beaucoup plus fructueuse au cours de la saison chaude, probablement parce que les bactéries y sont alors plus actives, permettant la multiplication naturelle des phages.

Tableau IV: Total des isolats de phages par bactérie cible

Bactérie cible	Isolats
SaA	25
ERV	16
PsA	40
Aci	11

Le tableau IV récapitule le nombre d'isolats de phages obtenus qui seront d'abord amplifiés, analysés génétiquement et au niveau de leur spécificité afin d'éliminer les phages non amplifiables, les phages semblables ainsi que les phages trop spécifiques envers une souche hôte (spectre d'action trop étroit) ou non-spécifiques, c'est-à-dire qui lysent des souches non souhaitées comme les souches non pathogènes par exemple.

3.2 Sélection des bactériophages

3.2.1 Test d'amplification

Les phages ont été amplifiés à 37°C en utilisant un ratio d'environ 1 phage pour 100 bactéries. Les concentrations en phages actifs sont évaluées après 6h et 24h d'amplification. Seuls les phages s'amplifiant à plus de 10^8 ufp/ml sont sélectionnés.

Tableau V: Amplification des isolats de phages après 24h

Bactéries		Nombre d'isolats	Amplification (ufp/ml)	Total d'isolats amplifiables
<i>Staphylococcus aureus</i>	SaA4	5 (1)	$(10^3) 10^9 - 10^{11}$	23/25
	SaA5	18 (1)	$(10^3) 10^7 - 10^{11}$	
<i>Enterococcus</i> sp.	Ensp1	2	10^9	16/16
	Ensp2	6	$10^7 - 10^9$	
	ERV3	0	-	
	Ensp4	4	10^8	
	Ensp6	4	$10^8 - 10^9$	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PsA1	17	$10^9 - 10^{11}$	39/40
	PsA6	4	$10^9 - 10^{10}$	
	PsA24	15	$10^9 - 10^{11}$	
	PsA25	3 (1)	$(-) 10^6 - 10^7$	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aci3	9	$10^8 - 10^{10}$	9/9

Les nombres entre parenthèses indiquent les phages ayant une moins bonne amplification

La grande majorité des bactériophages isolés s'amplifient très bien, et ce, après seulement 6h d'incubation (information non comprise dans le tableau V). Sur les 25 phages *Staphylococcus aureus*, 23 s'amplifient à un titre supérieur ou égal à 10^7 ufp/ml, tous les phages *Enterococcus* sp. et *Acinetobacter baumannii* isolés s'amplifient bien, de même que 39 des 40 phages *Pseudomonas aeruginosa*. Suite à cette étape, 3 phages non amplifiables à un niveau suffisamment élevé pour l'extraction d'ADN/ARN et pour un stockage à long terme, ont été éliminés.

3.2.2 Analyse du génome (profil de restriction)

L'extraction de l'ADN/ARN génomique des phages isolés se fait par précipitation au PEG et nécessite 5ml d'amplification à un titre d'au moins 10^8 ufp/ml. L'ADN est quantifié puis digéré afin de comparer les profils de fragments d'ADN obtenus par digestion avec des enzymes de restriction.

Tableau VI: Digestion des isolats de phages

Bactéries	Nb total d'isolats	Nb d'isolats de phages analysés	Nb digérés	Test RNase	Test DNase	Nombre de profils différents
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	23	6/23 HaeII 0/9 EcoRI 0/14 PstI 3/6 Mnl I 1/6 AluI	0/15	15/15	5 HaeII 3 Mnl I 1 Alu I
<i>Enterococcus</i> sp.	8*	6	4/6HaeII	/	/	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	36	36/36 HaeII 23/26 EcoRI 19/25HindIII	/	/	32 Hae II 17 EcoRI 8 HindIII
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9	9	9/9 HaeII	/	/	3

/ : non testé * : les 8 autres phages Ensp ont été abandonnés avant la digestion enzymatique car ils ne lysaient pas les souches de ERV.

Dans le cas de *Staphylococcus aureus*, très peu de phages (6) se sont avérés digérables avec l'enzyme HaeII, utilisée habituellement pour différencier les profils. D'autres enzymes de restriction ont donc été utilisées pour certains phages : EcoRI, PstI, MnlI et AluI avec peu de succès. Bien que les génomes des phages étaient composés d'ADN, et étant donné les difficultés à établir leur profil génomique, il n'y a pas eu d'acharnement du côté des digestions et les phages ont plutôt été classés selon leur profil précis de spécificité (voir section 3.2.3).

Les 8 phages *Enterococcus* sp. ont été classés en 3 profils HaeII différents, les 9 phages *Acinetobacter baumannii* en 3 profils et les 39 phages *Pseudomonas aeruginosa* en 32 profils HaeII différents. Pour ces derniers,

d'autres enzymes de restriction ont été utilisées afin de former des familles de phages basées sur les similarités de leur profil par différentes enzymes. 17 profils ont ainsi été obtenus avec EcoRI et 8 avec Hind III.

3.2.3 Tests de spécificité

3.2.3.1 *Staphylococcus aureus* (SaA)

Les phages SaA n'ayant pas été différenciés par les digestions enzymatiques, le profil lytique des 23 phages isolés amplifiables a été établi envers toutes les souches de *Staphylococcus aureus* à notre disposition pour pouvoir les classer et choisir les meilleurs. 7 phages ont démontré une affinité accrue envers les SARM c'est pourquoi ils ont été sélectionnés (résultats non présentés).

Afin de bien caractériser les bactériophages isolés, une des étapes les plus importante est d'établir leur spectre lytique précis. Les chiffres présentés dans le tableau VII représentent le nombre de souches lysées par chaque phage (par genre/espèce). Les bactéries « autres » sont des souches non apparentées à la bactérie hôte du phage, comme par exemples *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, etc. Les bactéries non pathogènes sont des souches d'*E.coli* de la flore normale.

Tableau VII: Potentiel lytique de 7 phages SaA envers différentes souches bactériennes

Phage	SARM (/10)	SASM (/15)	SaE (/7)	AUTRES (/ 23)	Non patho. (/19)
BP13	7	12	0	0	0
BP14	9	11	0	0	0
BP15	9	8	0	0	0
BP16	9	11	0	0	0
BP17	8	9	0	0	0
BP18	9	5	0	0	0
BP19	9	6	0	0	0

Les 7 phages SaA présentés dans le tableau ci-dessus sont spécifiques à *Staphylococcus aureus*, la plupart présentent même une affinité plus élevée envers les souches de SARM. Aucun phage n'a réagi avec *Staphylococcus epidermidis*, les bactéries autres, ni avec les souches non pathogènes. Ce sont donc tous d'excellents candidats en terme de spécificité.

Le test de spécificité ne permettant pas de déterminer si les phages s'attachent aux bactéries sans les lyser, les 7 phages ont été amplifiés avec tous les isolats bactériens SaA de notre banque de souches (25). Si le phage s'attache à la bactérie sans la lyser (phage tempéré ou cycle lytique interrompu), le nombre de phages libres diminuera et on obtiendra une amplification négative, c'est-à-dire un titre d'au moins un log de moins que le phage sans bactérie (contrôle). Une absence d'amplification signifie que le phage est stable en présence de la bactérie testée et n'interagit pas avec celle-ci et une amplification positive (titre d'au moins un log de plus que le phage seul) reflète une bonne amplification en présence de la bactérie testée.

Tableau VIII: Amplification croisée de 7 phages SaA avec toutes les souches de bactériennes de SaA

Phage	SARM (/ 10 souches)			SASM (/15 souches)		
	Ampli (+)	Non interaction (0)	Rétention (-)	Ampli (+)	Non interaction (0)	Rétention (-)
BP13	9	1	0	12	2	0
BP14	9	1	0	11	4	0
BP15	9	1	0	11	4	0
BP16	9	0	0	13	2	0
BP17	9	0	0	11	3	0
BP18	9	1	0	9	5	0
BP19	8	2	0	5	10	0

La plupart des 7 phages s'amplifient bien dans toutes les souches de SaA. Certains phages n'ont aucune interaction avec des souches de SaA particulièrement du côté des SASM sans toutefois être retenus dans la bactérie, indiquant que les phages sélectionnés semblent être des phages lytiques.

3.2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa* (PsA)

24 phages parmi les 39 isolés ont été sélectionnés selon leur profils de digestion pour évaluer leur spectre lytique envers des souches de PsA clinique.

Tableau IX: Potentiel lytique des phages PsA envers différentes souches de PsA cliniques

Phage	Bactérie																Total (/15)
	1*	24	25	26	27	28	29	30	31	36	37	38	39	40	41	42	
PsA1 W59	+	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	6
PsA1 W60	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	3
PsA1 W61	+	-	-	-	+/-	+	-	+	+/-	-	+	-	+/-	+	-	-	4
PsA1 W64	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	3
PsA1 W67	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	0
PsA1 W68	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	0
PsA1 W70	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	0
PsA1 W75	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	+	-	+/-	+	-	-	3
PsA1 W76	+	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	0
PsA1 W77	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	0
PsA1 W78	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	0
PsA1 W81	+	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	4
PsA1 W82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
PsA24 W65	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	4
PsA24 W68	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	1
PsA24 W69	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	+/-	-	+/-	-	+/-	3
PsA24 W71	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	2
PsA24 W72	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	-	-	+/-	-	+/-	3
PsA24 W73	+/-	+	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-	+	-	-	-	-	-	3
PsA24 W82	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-	-	-	2
PsA24 W83	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	-	-	+/-	-	+/-	3
PsA24 W102	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	3
PsA24 W103	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	-	-	+/-	-	-	3
PsA24 W104	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	3

+ = lyse +/- = lyse partielle -: aucune plage de lyse

* : PsA1 n'est pas une souche clinique

Les phages PsA isolés lysent très peu de souches cliniques (le meilleur en lyse 5/14). En moyenne, les phages PsA réagissent avec 3 souches cliniques sur 14 soit un spectre très restreint. 7 phages ne reconnaissent aucune souche et 9 phages sur 24 présentent le même profil de spécificité (3 mêmes souches lysées représentés en gris dans le tableau). À la lumière de ces résultats, le potentiel de ces phages tant sur le plan préventif que thérapeutique semble très limité et ce projet a temporairement été mis de côté.

3.2.3.3 *Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV)

Les 16 phages Ensp isolés ont été testés contre 15 souches cliniques d'*Enterococcus.sp.*

Tableau X: Potentiel lytique des phages Ensp envers différentes souches d'*Enterococcus sp.* cliniques

Bactérie/ Phage	Ensp				ERV										
	1	2	4	6	3	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ensp1 W64	6	6	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 1 W104	8	8	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W63	7	8	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W64	3h	9	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W65	9	9	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W93	6	8	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W117	4	9	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 2 W119	4	9	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 4 W122	/	/	8	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 4 W123	/	/	8	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 4 W124	/	/	8	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 4 W125	/	/	8	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 6 W122	/	/	/	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 6 W123	/	/	/	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 6 W124	/	/	/	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensp 6 W125	/	/	/	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8 = 10⁸ ufp/ml 3h = 10³ lyse partielle /: non testé -: aucune plage de lyse

8 phages Ensp ne reconnaissent que 2 ESV (Enterococcus sensible à la vancomycine) tandis que les 8 autres ne reconnaissent que leur hôte avec lequel ils ont été isolés. Aucun phage Ensp ne reconnaît les souches résistantes à la vancomycine ciblées, ils ont donc tous été abandonnés dans le cadre de ce projet.

3.2.3.4 *Acinetobacter baumannii* (Aci)

Les 3 phages Aci sélectionnés ont été mis en contact respectivement avec leur hôte, *A. baumannii*, d'autres souches d'*Acinetobacter* sp., des souches non apparentées et des souches non pathogènes de la flore normale. Les résultats sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI: Potentiel lytique des phages Aci envers différentes souches bactériennes

Phage	<i>Acinetobacter</i> sp. (/ 6)	<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> (/ 3)	Autres (/ 23)	Non patho. (/ 19)
BP20	0	1	0	0
BP21	0	1	0	0
BP22	0	1	0	0

Ces trois phages présentent un spectre d'action limité à leur bactérie hôte, aucune réaction n'a été relevée envers d'autres *Acinetobacter* sp., ni envers des bactéries non apparentées ou des bactéries non pathogènes.

Conclusion :

Les phages *Pseudomonas aeruginosa* ayant un spectre lytique trop restreint et les phages *Enterococcus* sp. ne reconnaissant pas de souches cliniquement pertinentes de ERV, ces phages n'ont pas été étudiés plus en détail. Les phages *Staphylococcus aureus* (BP13,14,15,16,17,18,19) et *Acinetobacter baumannii* (BP20,21,22) ont fait l'objet d'une étude plus précise vu leur potentiel basé sur leur spécificité.

3.3 Caractérisation des bactériophages

3.3.1 Cinétique d'adsorption

En mettant des concentrations élevées de phages et de bactéries en contact et en filtrant à différents temps pour déterminer la concentration de phage libre, il est possible d'évaluer la cinétique d'adsorption d'un phage à sa bactérie hôte.

Tableau XII: Temps de contact qui permet l'adsorption de 99% du phage à sa bactérie hôte

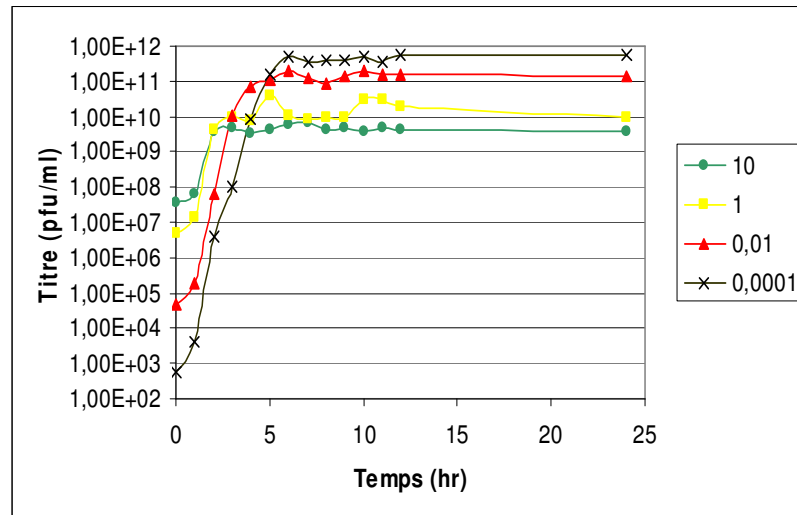
Phage		Temps de contact (min)
SaA	BP13	6
	BP14	6-10
	BP15	10
	BP16	20
	BP17	10
	BP18	>30 (95% après 30min)
	BP19	20
Aci	BP20	15
	BP21	7
	BP22	15

Les phages BP13, BP14, BP15, BP17 et BP21 sont très rapides à s'adsorber à leur hôte. Un temps de 10 min de contact entre le phage et son hôte est recommandé avant toute amplification pour obtenir un rendement maximal. Pour ce qui est des autres phages, un temps de contact d'au moins 20 min est nécessaire afin de maximiser l'amplification.

3.3.2 Cinétique de réplication

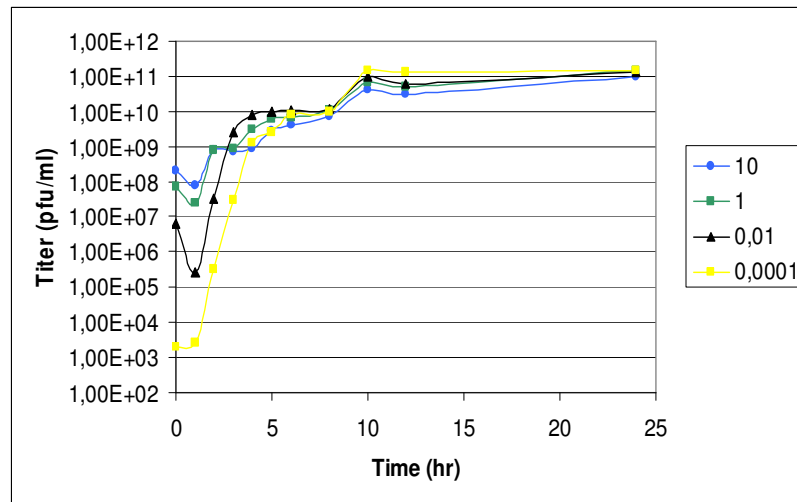
L'étude de la cinétique de réplication des bactériophages permet d'évaluer le comportement du phage avec sa bactérie hôte et d'établir les meilleurs paramètres pour son amplification. BP14 et BP15 ont été étudiés en détail avec différents MOI (multiplicity of infection), c'est-à-dire différents ratios de phage/bactérie.

Figure 6: Cinétique de répliation du phage BP14 en milieu LB à 37°C pendant 24 h à différents MOI



La figure 6 démontre qu'en changeant le MOI, il est possible d'obtenir de meilleurs rendements de phage. En effet, plus le ratio phage/bactérie est faible, c'est-à-dire que la concentration de phage est plus faible que celle de la bactérie, plus le phage BP14 s'amplifie. L'amplification atteint un maximum de 5×10^{11} ufp/ml autour de 6 h et ce maximum se maintient ensuite pour au moins 24 h.

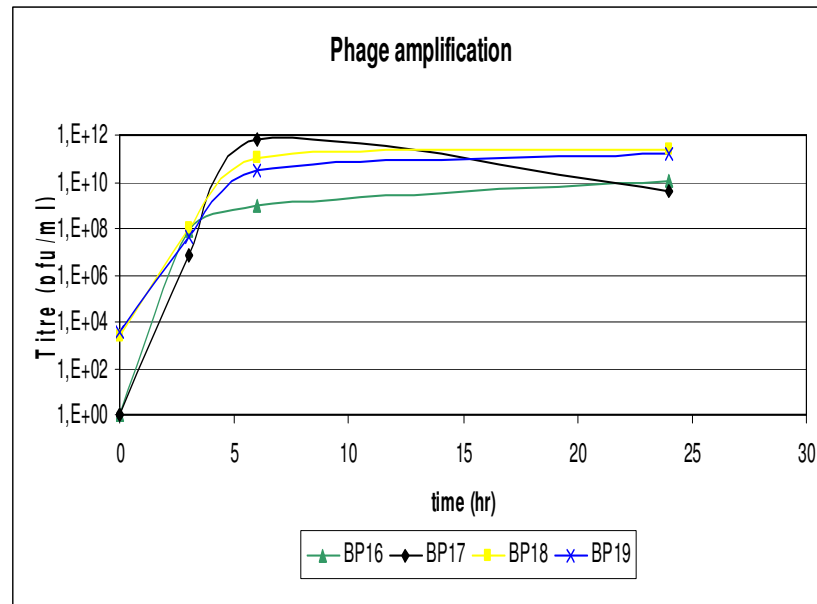
Figure 7: Cinétique de répllication du phage BP15 en LB à 37°C pendant 24 h à différents MOI



Comme dans le cas de BP14, le phage BP15 s'amplifie mieux en utilisant un MOI faible de 0,0001, ainsi une quantité optimale de $1,4 \times 10^{11}$ ufp/ml de phages est obtenue en 10 h.

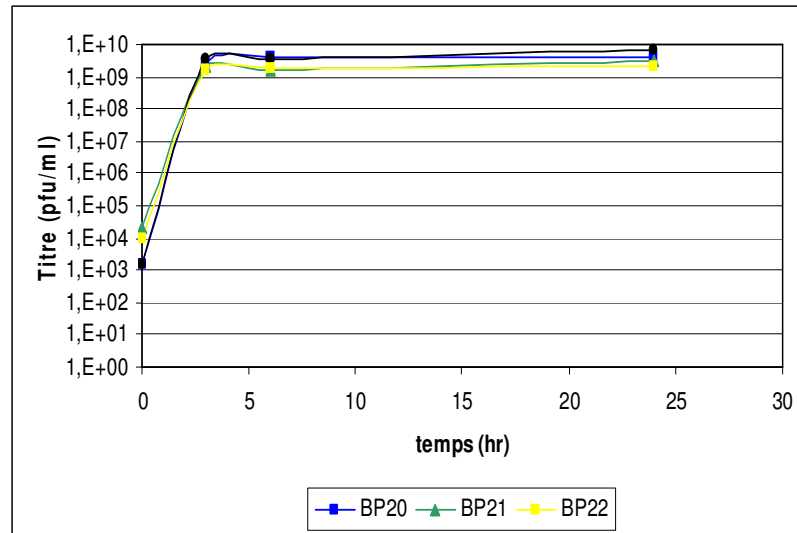
Tous les prochains phages caractérisés seront donc amplifiés en utilisant un MOI d'environ 0,001.

Figure 8: Cinétique de répliation des phages SaA à 37°C en milieu LB pendant 24 h à un MOI de 0,001



À un MOI de 0,001 les 4 phages s'amplifient bien atteignant tous un titre au delà de 10^{11} ufp/ml et rapidement (6 h) excepté le phage BP16 qui atteint un maximum de 10^9 ufp/ml, d'autres MOI pourraient être testés pour vérifier les conditions d'amplification optimales. Il faut noter que le titre du phage BP17 a tendance à chuter entre 6 h et 24 h, contrairement aux autres phages.

Figure 9: Cinétique de répliation des phages Aci à 37°C en milieu LB pendant 24 h à un MOI de 0,001



Les 3 phages *Acinetobacter baumannii* s'amplifient très rapidement (4 h) mais le titre ne dépasse pas 10^{10} ufp/ml. D'autres MOI pourraient être testés pour vérifier les meilleures conditions d'amplification.

3.3.3 Amplification 250ml

Une fois les meilleures conditions d'amplification établies, une large quantité de phages doit être produite afin de compléter la caractérisation en utilisant toujours la même préparation (même lot).

Tableau XIII: Titre des phages après 6 h d'amplification dans 250 ml de LB à 37°C (ufp/ml)

Phage		Titre (ufp/ml)
SaA	BP13	1×10^{10}
	BP14	5.9×10^{11}
	BP15	4.1×10^{10}
	BP16	1.6×10^9
	BP17	2×10^9
	BP18	6.4×10^9
	BP19	5.8×10^9
Aci	BP20	4×10^8
	BP21	2×10^8
	BP22	2×10^8

Les concentrations obtenues pour les phages SaA sont satisfaisantes, se situant entre 10^9 et 10^{11} ufp/ml. La concentration maximale de 10^{10} ufp/ml obtenue en cinétique de réplication pour les phages Aci précédemment n'a pu être reproduite. Un titre de 10^8 ufp/ml s'avère tout de même suffisant pour poursuivre la caractérisation avec ces préparations. En production de masse par contre, il faudrait évaluer l'impact sur le coût de production.

Ces amplifications sont utilisées pour toutes les expériences qui suivront.

3.3.4 Détermination des conditions de purification

Afin de déterminer les meilleures conditions de purification des phages, ils ont été centrifugés à différentes vitesses pendant 1 h et leurs concentrations ont été évaluées par titration. Les phages BP14, BP17, BP18 et BP21 ont aussi été purifiés par TFF (tangential flow filtration) afin de comparer le pourcentage de récupération obtenu ainsi que l'effet de la technique de purification sur la stabilité (testé sur BP14 uniquement).

Tableau XIV : Pourcentage de récupération des principaux phages après purification par centrifugation à différentes vitesses pendant 1 h à 4°C et par TFF

Phage	8000g	12 000g	15 000g	48 000g	TFF
BP14	5%	12%	34%	103%	779%
BP15	3%	8%	5%	60%	/
BP16	/	76%	/	95%	/
BP17	17%	55%	58%	37%	107%
BP18	0.2%	3%	3%	29%	277%
BP19	/	11%	/	43%	/
BP20	3%	10%	39%	61%	/
BP21	1%	1%	2%	42%	196%
BP22	/	4%	/	82%	/

% titre du culot/ titre initial

Par centrifugation, le meilleur taux de récupération est obtenu avec une centrifugation haute vitesse à 48 000 g pour tous les phages, exceptés BP16 et BP17 qui peuvent tout aussi bien être centrifugés à 12 000 ou 15 000 g en obtenant des pourcentages de récupération presque aussi bons. Toutefois, en purifiant BP14, BP17, BP18 et BP21 par TFF, un taux de récupération et une concentration du phage nettement supérieurs à la centrifugation sont obtenus. La purification par TFF ayant été testée à la fin de ce projet, tous les phages ont été purifiés par centrifugation dans les résultats présentés ci-après (seuls quelques tests isolés ont été réalisés sur certaines préparations par TFF).

Il est à noter que le phage BP13 a été abandonné avant cette étape car des problèmes de titration sont survenus en cours de route. Le phage s'est avéré indétectable à plusieurs reprises pour une raison inconnue.

3.3.5 Stabilité

La stabilité des phages a été vérifiée à 4°C et à 37°C (jusqu'à 2 semaines) en milieu LB et tampon SM et à RT en tampon SM.

Tableau XV : Stabilité des phages SaA en milieu LB et tampon SM à différentes températures (10^8 ufp/ml)

T°	Milieu /Tampon	BP14		BP15	BP16	BP17	BP18	BP19
		Centri 48000 g	TFF					
4°C	LB	1 mois	Entre 10 jours et 1 mois	2 mois	3mois	>3mois *	>3mois *	2mois
	SM	1 mois	3 mois	2 mois	3mois	>3mois *	>3mois *	2mois
RT	SM	< 14j	Entre 10 jours et 1 mois	1 mois	2sem.	1mois	1mois	2sem.
37°C	LB	1j	/	2j	/	3j	/	3j
	SM	1j	2j	1j	1j	3j	7j	1j

/: non testé * : stabilité toujours en cours

À 4°C en milieu LB ou tampon SM, les phages BP16, BP17 et BP18 sont toujours stables après 3 mois tandis que les phages BP14, BP15 et BP19 purifiés sont stables entre 1 et 2 mois. À température pièce, les phages BP15, BP17 et BP18 restent stables pendant 1 mois, les phages BP16 et BP19 pendant 2 semaines tandis que le phage BP14 est instable avant d'atteindre 2 semaines. À 37°C, tous les phages ne sont stables que pour quelques jours en SM : 7 jours pour le phage BP18, 3 jours pour BP17, et 24h pour les phages BP14, BP15, BP16 et BP19. En plus de la stabilité après purification par centrifugation à 48 000 g, la stabilité du phage BP14 après purification par filtration tangentielle a été vérifiée. La stabilité de ce phage n'ayant pas significativement été améliorée excepté à 4°C où elle s'est prolongée de 2 mois, les autres phages n'ont pas été purifiés par 'TFF' pour la vérification de leur stabilité.

Tableau XVI: Stabilité des phages *Acinetobacter baumannii* en milieu LB et tampon SM à différentes températures (10^8 ufp/ml)

Température	Milieu	BP20	BP21	BP22
4°C	LB	> 3 mois*	> 3 mois*	> 3 mois*
	SM	> 3 mois*	> 3 mois*	> 3 mois*
RT	SM	> 3 mois*	3 mois	3 mois
37°C	LB	1 sem.	/	/
	SM	1 sem.	>2 sem.	>2 sem.

/: non testé * : stabilité toujours en cours

Pour ce qui est des phages Aci présentés dans le tableau XVI, à 4°C les 3 phages sont toujours stables après 3 mois autant en milieu LB qu'en SM. À température pièce en SM, le phage BP20 est toujours stable après 3 mois tandis que les 2 autres, BP21 et BP22 montrent une instabilité après 3 mois. À 37°C les phages BP21 et BP22 sont encore stables après 2 semaines tandis que le phage BP20 n'est stable qu'une semaine.

3.3.6 Taille et profil du génome

La taille du génome a été déterminée par l'analyse de l'acide nucléique sur FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) puis l'ADN a été digéré par différentes enzymes de restriction (EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, SalI et HaeII) afin d'établir le profil de digestion complet du phage.

Tableau XVII: Taille génomique des principaux phages (kb)

Phage		Taille génome (kb)
SaA	BP13	20
	BP14	20
	BP15	21
	BP16	145,5
	BP17	>48.5
	BP18	20
	BP19	~20
Aci	BP20	42
	BP21	42
	BP22	41

Le génome des phages *Staphylococcus* est approximativement de 20 kb, excepté pour BP16 et BP17 qui possèdent un génome plus grand que 48,5 kb. Les 3 phages *Acinetobacter* possèdent tous un génome d'environ 42 kb.

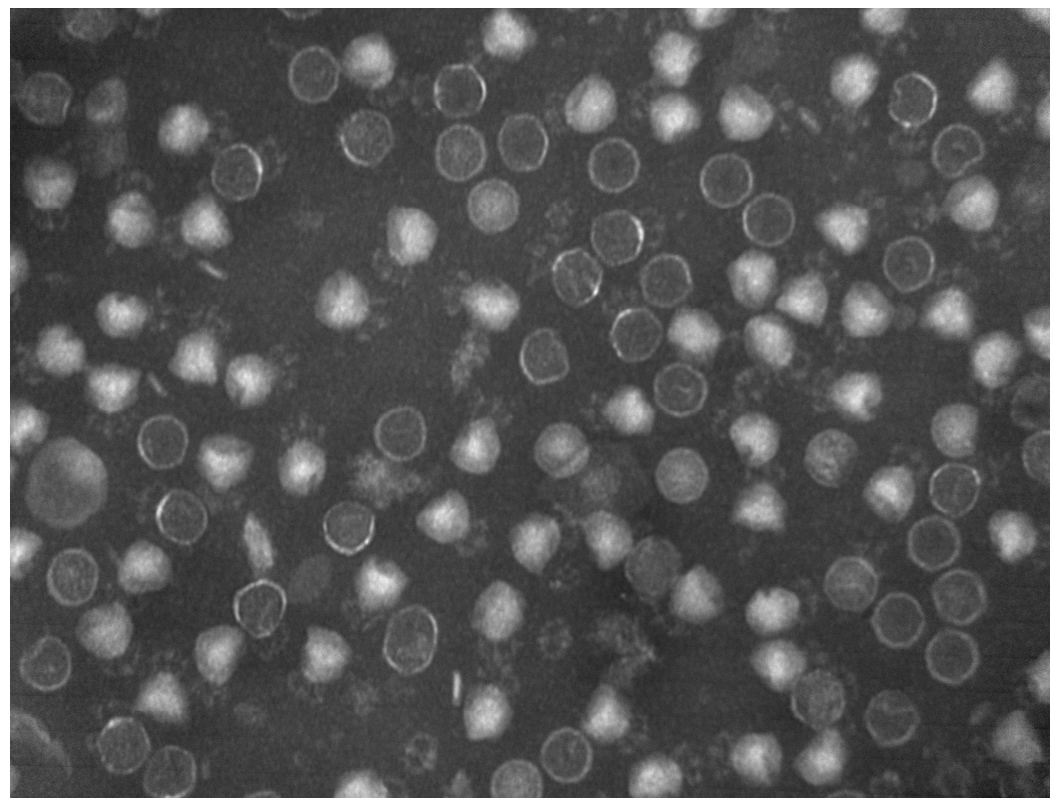
La digestion des génomes de tous ces phages par les enzymes HaeII, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI et Sall a démontré que les phages sont constitués d'ADN double brins car digérés par la plupart des enzymes et qu'ils sont tous différents (résultats non présentés).

3.3.7 Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission du phage BP14 a été réalisée à l'Institut Armand-Frappier par le Dr Robert Alain. Des photos ont été prises

pour une préparation en LB brute et une autre préparation purifiée par centrifugation et resuspendue dans du tampon SM à une concentration de 10^9 ufp/ml. La photo présentée ci-dessous représente la préparation purifiée en SM, colorée négativement et centrifugée 5 min à 120 000g.

Figure 10 : Microscopie électronique du phage BP14



HA-017-21.tif
BP14
Biophage
Print Mag: 299000x @ 11.0 in
16:27 07-17-08
Microscopist: R. Alain
Phages

100 nm
HV=75.0kV
Direct Mag: 80000x
SME - INRS-Institut Armand Frappier

BP14 possède une tête isométrique hexagonale avec un diamètre de 42nm et une courte queue, droite, épaisse et non contractile de 25nm. Ces caractéristiques attribuent le phage à la famille des *Podoviridae*. Sur la figure

10, les phages blancs contiennent leur matériel génétique tandis que les noirs sont des têtes vides, donc des phages qui ont perdu leur matériel génomique. La préparation renferme peu de débris cellulaires.

3.3.8 Susceptibilité aux désinfectants

La sensibilité des phages envers différents désinfectants est testée en présence de matériel organique (sérum fœtal bovin). Les concentrations de désinfectants utilisées sont celles recommandées par le fabricant.

Tableau XVIII : Effet de différents désinfectants utilisés dans le milieu hospitalier sur les principaux phages

Phage/ Bactérie hôte	Phenosept 0,7%	Dynakil SQ 0,4%	AIRx44 1,6%	Virkon 1%	Virox 5 1/32	Accel TB	Javex 1,2%
BP14	-	-	-	+	+	+	+
BP15	-	-	-	+	+	+	+
BP16	/	-	-	/	/	+	+
BP17	/	-/+	-/+	/	/	+	+
BP18	/	-	-	/	/	+	+
BP19	/	-	-	/	/	+	+
BP20	/	-	-	/	/	+	+
BP21	/	-/+	-	/	/	+	+
BP22	/	-/+	-	/	/	+	+
SaA-4/5	+	+	+	+	+	+	+
Aci-3	/	+	/	/	/	+	+

+ = inactivation du phage en moins de 5min - = aucun effet -/+ = diminution d'environ 2-3 log / = non testé

Le virkon 1%, le Virox 5, l'Accel TB ou le Javex 1,2% peuvent être utilisés pour inactiver les phages. Le phenosept 0,7%, le Dynakil 0,4% et le AIRX44 1,6% n'ont pas ou n'ont que très peu d'effets sur l'infectivité des phages.

3.3.9 Taux d'endotoxines

Le dosage des endotoxines est nécessaire pour s'assurer que les LPS contenus dans la membrane de la bactérie hôte (Gram -) ne sont pas présents en grande quantité dans la préparation de phage. Le dosage d'endotoxines a été effectué pour les 3 phages *Acinetobacter baumannii* (Gram -) purifiés par centrifugation (48 000g) et sur un seul (BP21) purifié par TFF. La limite tolérée par la FDA pour l'eau stérile injectable ou irrigable est de 0.25 EU/ml et de 0,5 EU/ml pour l'eau destinée à l'inhalation.

Tableau XIX: Taux d'endotoxines des phages Aci (10^8 ufp/ml)

Phage	Taux d'endotoxines (EU/ml)	
	Après centri.	Après TFF
	48000 g	100kD
BP20	9600	/
BP21	3200	102 400
BP22	9600	/

Les phages BP20 et BP22 présentent le même taux d'endotoxines à 9600 EU/ml tandis que celui de BP21 s'élève à 3200 EU/ml après 1 h de centrifugation à 48000 g et 102 400 EU/ml après la filtration tangentielle.

3.3.10 Détermination de la contamination bactérienne

La stérilité des préparations de phages (par centrifugation) est vérifiée en déposant 100 µl de phages concentrés dans 400 µl de LB sur un pétri LB qui sont ensuite incubés 2 semaines et demie à 37°C avec et sans amplification préliminaire en milieu LB.

Les préparations de BP14, BP15, BP16, BP17, BP18, BP19, BP20, BP21 et BP22 ont été testées et sont toutes exemptes de bactéries.

3.3.11 Efficacité *in vitro*

L'efficacité de lyse *in vitro* des phages est testée en milieu LB à 37°C et RT (room temperature). Le phage est incubé avec sa bactérie hôte en utilisant un faible MOI (~ 0,001= 1 phage pour 1000 bactéries) et la densité optique est lue à toutes les heures jusqu'à ce que la bactérie prenne le dessus, c'est-à-dire lorsque la DO augmente rapidement. Les temps présentés dans le tableau XX représentent la période pendant laquelle la préparation est demeurée claire (élimination bactérienne).

Tableau XX : Efficacité *in vitro* des phages en milieu LB

Phage	Lyse bactérienne	
	37°C	RT
BP13	entre 6 et 24h	/
BP14	10h	28h
BP15	24h	35h
BP16	24h	>72j
BP17	entre 122et 169h (~6j)	45j
BP18	24h	30h
BP19	30h	36h
BP20	6h	8h
BP21	6h	9h
BP22	6h	8h

Certains phages sont très actifs car ils maintiennent un niveau de bactérie hôte très bas pendant une longue période (>24h à 37°C particulièrement BP17 qui est efficace pendant 6 jours). Tous les phages testés rencontrent le critère minimum de contrôle du niveau bactérien, soit jusqu' 6h, autant à 37°C qu'à température ambiante (la plupart des phages laissent la bactérie prendre le dessus en 6h). Les phages BP16 et BP17 présentent une très bonne efficacité de lyse bactérienne à long terme à température ambiante, ils sont aptes à maintenir un niveau de bactérie quasi nul pendant plus d'un mois.

4 DISCUSSION

La médiatisation de l'écllosion du *C. difficile* en 2004 entraîna une prise de conscience collective face à la gravité et la fréquence des infections nosocomiales au Québec. L'augmentation croissante de l'incidence des bactéries multi résistantes aux antibiotiques face au laborieux et coûteux processus de développement de nouvelles classes d'antibiotiques pour leur faire face, maintient toujours la problématique du contrôle et du traitement des infections nosocomiales.

Aujourd'hui, malgré une diminution significative des taux d'infections nosocomiales, on observe 2,3 fois moins de cas de diarrhées associées à *C. difficile* d'origine nosocomiale en 2007-2008 par rapport à la période d'écllosion de 2004-2005 et ce, grâce à l'implantation de protocole d'hygiène coûteux et souvent difficile de contrôle (INSPQ, 2008). Toutefois, force est de constater que le problème perdure et le risque de contracter une infection nosocomiale générale est toujours présent, se situant entre 5 et 10% des admissions hospitalières. De nouvelles approches préventives sont toujours recherchées et dans ce contexte, l'utilisation de bactériophages offre une alternative de lutte antibactérienne naturelle qui répond spécifiquement à cette problématique. Les phages possèdent des attributs bactéricides qui apparaissent prometteurs en tant qu'agents préventifs et thérapeutiques dans cette lutte contre les infections nosocomiales et ce, sur plusieurs fronts.

Dans le cadre de ce projet, des phages contre les bactéries cibles *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* résistant à la vancomycine et *Acinetobacter baumannii* ont été

isolés à partir des eaux usées de la ville de Montréal et sélectionnés selon leur capacité d'amplification, leur profil génomique par des enzymes de restriction et leur potentiel lytique envers des souches bactériennes de la même espèce que leur hôte. Les phages présentant un bon potentiel ont été caractérisés en détail : profil de spécificité complet, caractéristiques d'infection et de répllication, stabilité à long terme, profil du génome, microscopie électronique, pureté, susceptibilité aux désinfectants et efficacité *in vitro*. Cette caractérisation détaillée a pour but la démonstration de la spécificité des phages, de leur statut sécuritaire ainsi que la confirmation de leur efficacité *in vitro*, caractéristiques préalables à leur utilisation *in vivo*.

La grande biodiversité et la large dispersion environnementale des *Pseudomonas aeruginosa* est sans doute responsable du nombre élevé de phages *Pseudomonas aeruginosa* qui ont été isolés. Ils ont cependant été mis de côté dû à leur faible potentiel. Le spectre lytique de 24 phages a été évalué envers 15 souches cliniques de l'hôpital du Sacré-Cœur. En moyenne, ces phages lysent 3 souches sur 15, le meilleur en lyse 5. De plus, 7 phages ne reconnaissent aucune souche autre que celle avec laquelle ils ont été isolés. Les 8 phages *Enterococcus* isolés ne lysant pas les bactéries cibles résistantes à la vancomycine ont aussi été abandonnés dans le cadre de ce projet. Le potentiel tant préventif que thérapeutique de ces phages paraissant très limité, les efforts ont été mis sur les deux autres cibles bactériennes : SARM et *Acinetobacter baumannii* qui ont permis d'obtenir des phages potentiellement utilisables en prévention et traitement des infections.

4.1 SARM

Parmi les 25 phages *Staphylococcus aureus* isolés, 7 phages ont été caractérisés aux niveaux génomique et biologique pour démontrer essentiellement qu'ils sont spécifiques, efficaces et sécuritaires. Ils ont été baptisés : BP13, BP14, BP15, BP16, BP17, BP18 et BP19.

Les 25 phages de départ ont d'abord tous été amplifiés en milieu LB à 37°C pendant 6 h et 24 h pour s'assurer que leur titre s'élève à plus de 10⁸ ufp/ml pour un stockage à long terme et une extraction d'ADN/ARN efficace. 23 phages se sont amplifiés à un titre suffisant en 6 h (résultats non présentés) ou 24 h (Tableau V). Une fois cette étape franchie, le génome des phages est extrait afin de vérifier que les profils de digestion des phages isolés soient différents. L'enzyme utilisée en routine pour ce faire est HaeII. Cependant, très peu de phages SaA n'ont été digérés par cette enzyme. Il a donc fallu utiliser d'autres enzymes pour différencier les phages. Des essais ont été faits avec EcoRI, PstI, MnlI et AluI sans toutefois obtenir de digestion complète. L'hypothèse que ces phages SaA soient tous des phages ARN a été écartée par des digestions avec la RNase et la DNase qui ont confirmé que tous étaient composés d'ADN. Au lieu de classer ces phages par la digestion enzymatique, il a plutôt été décidé de les différencier selon leur profil précis de spécificité.

Les 7 phages présentant une spécificité accrue envers les souches de SARM sans reconnaître les autres espèces de *Staphylococcus*, les autres genres de bactéries et les souches non pathogènes ont été sélectionnés pour une caractérisation détaillée. Les résultats obtenus pour ces phages avec les tests de spécificité étaient clairs et sans équivoque (plages de lyse complètes) et ont été

effectués à au moins deux reprises. Ces 7 phages sont hautement spécifiques à *Staphylococcus aureus* avec une affinité accrue envers les souches de SARM même s'ils lysent aussi certaines souches de SASM, ils ne s'attaquent pas aux bactéries non pathogènes de la flore normale comme le font les antibiotiques ni aux bactéries non apparentées (Tableau VII).

Pour s'assurer que ces phages ne sont pas tempérés, c'est-à-dire qui s'intègrent au génome de la bactérie sans la lyser, ils ont été amplifiés avec toutes les souches de SaA cliniques mis à notre disposition (25 souches). Ces amplifications démontrent que tous les phages s'amplifient bien ou n'ont aucune interaction, et surtout ne sont pas retenus dans les bactéries testées. Ce test confirme donc qu'il s'agit de 7 phages lytiques (pour les souches testées). Les phages tempérés sont à éviter en thérapie phagique car ils ne tuent pas à 100% la bactérie cible et ils peuvent transférer et propager des gènes de virulence ou de toxines entre les souches bactériennes (Duckworth et al., 2002) (Tableau VIII).

Le test d'adsorption a démontré que les phages BP13, BP14, BP15 et BP17 s'adsorbent rapidement à leur bactérie hôte, soit en moins de 10 min (Tableau XII). Pour ce qui est des autres phages, un temps de contact entre le phage et la bactérie d'au moins 20 min est nécessaire afin d'obtenir une bonne amplification.

L'étude de la cinétique de répllication des phages en utilisant différents ratios de phage/bactérie (MOI : « multiplicity of infection »), c'est-à-dire amplifier le phage en évaluant sa concentration à différents temps d'incubation, a mis en évidence que de meilleurs rendements de phages sont obtenus en utilisant de faibles MOI. On aurait tendance à croire que, plus la quantité de

phages au départ est grande, meilleurs seraient les rendements. En réalité, plus la concentration de départ du phage est faible par rapport à celle de la bactérie, mieux le phage s'amplifie *in vitro*. Comme les phages disposent d'une grande quantité de bactéries, qui agissent ici comme « substrats », ils peuvent se multiplier plus rapidement et plus efficacement (Figure 6, Figure 7, Figure 8).

Rares sont les phages caractérisés *in vitro* dans la littérature, particulièrement les phages contre les bactéries Gram positif (Wills et al., 2005). Pour établir une légère comparaison de cinétique, une étude réalisée avec des phages *Campylobacter* à différents MOI rapporte un déclin de phages rapide pendant les 8 premières heures de la cinétique en utilisant de forts MOI. Toutefois, après 24h, le même niveau de phages est atteint peu importe le MOI utilisé (Carillo et al., 2005). Ce qui peut se comparer avec la cinétique de répllication observée pour le phage BP15 (Figure 7).

Un autre facteur important de la caractérisation des phages est leur stabilité. Pour mimer les conditions thermiques du corps humain, la stabilité à 37°C est vérifiée pendant deux semaines. La stabilité à température pièce (RT) est réalisée jusqu'à 2 ans pour fins de désinfection, d'administration en solution ou de stockage. La stabilité à 4°C s'échelonne aussi jusqu'à 2 ans ou plus pour le stockage à long terme du phage dans différents milieux ou tampons. À 37°C, les phages BP14 et BP15 purifiés par centrifugation ne sont pas stables plus de 24h. À RT, en milieu LB ou SM, BP14 n'est stable que pour un maximum de 2 semaines et BP15 pour 1 mois. À 4°C, BP14 est stable 1 mois en LB et SM et BP15 2 mois. Suite à ces résultats, la stabilité de BP14 a été testée après purification par filtration tangentielle, pour s'assurer que le problème de stabilité ne provenait pas de la centrifugation qui pourrait endommager le phage. La stabilité du phage n'a guère été améliorée à 37°C et température

pièce mais s'est prolongée de 2 mois à 4°C (Tableau XV). Ces 2 phages posent donc un problème de stabilité à long terme et ne seraient pas des candidats idéaux pour des études en milieu hospitalier à des fins de désinfection ou de thérapie car le stockage pourrait être problématique. Les autres candidats présentent une stabilité à 4°C d'au moins 3 mois excepté BP19 qui n'est stable que pendant 2 mois. À température pièce, les phages BP16 et BP19, sont stables durant 2 semaines dans le tampon SM tandis que les phages BP17 et BP18 le sont pendant 1 mois. À 37°C, tous les phages ne sont stables que pour quelques jours en SM : 7 jours pour le phage BP18, 3 jours pour BP17, et 24h pour les phages BP14, BP15, BP16 et BP19. Donc, BP16, BP17 et BP18 présentent un bon potentiel de conservation à 4°C. BP17 et BP18 sont les meilleurs candidats qui pourraient être utilisés à température pièce et 37°C.

La taille du génome des phages a été déterminée par FIGE. Le génome des 7 phages est d'approximativement 20 kb excepté pour BP16 et BP17 qui possèdent un génome plus grand que 48,5 kb. En guise de comparaison, dans une étude expérimentale chez les souris utilisant le phage Φ MR11, un phage *Staphylococcus aureus* de la famille des *Siphoviridae*, le génome est évalué à 43kb (Matsusaki et al., 2003).

Le profil de digestion des phages a été établi en utilisant différentes enzymes de restriction : EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, Sall et HaeII. Comme le génome des 7 phages a pu être clivé par la plupart des enzymes de restriction, ils sont donc tous composés d'ADN double brin et il a été confirmé qu'ils sont bien tous différents.

À ce jour, la microscopie électronique et le séquençage du génome n'ont pu être faits pour tous les phages sélectionnés. BP14 est le seul pour

lequel nous avons une image en microscopie électronique à transmission et une séquence génomique. C'est un phage qui possède une tête isométrique hexagonale avec un diamètre de 42 nm et une courte queue droite, épaisse et non contractile de 25 nm. Ces caractéristiques attribuent BP14 à la famille des *Podoviridae* (Figure 10). À ma connaissance, tous les phages *Staphylococcus aureus* caractérisés en microscopie électronique rapportés dans la littérature à ce jour font partie de la famille des *Myoviridae* ou des *Siphoviridae* (Matsuzaki, 2003; O'Flaherty, 2005; Gill, 2006; Capparelli, 2008; Merabishvili, 2009). La microscopie électronique a aussi permis de confirmer l'absence de débris cellulaire. L'analyse du génome tant au niveau nucléaire que protéique et la comparaison avec les séquences disponibles ont démontré qu'il existe une homologie assez forte avec 4 phages actuellement déposés dans les banques génomiques. La brevetabilité de BP14 semble cependant possible et une caractérisation complète doit être finalisée, incluant des tests d'efficacité pour déposer le brevet pour des applications définies.

La méthode de purification des phages utilisée a été la centrifugation à 48 000 g même si les rendements sont nettement supérieurs avec le TFF (Tableau XIV). Cette technique ne semble pas permettre une aussi bonne purification basé sur les résultats obtenus avec les tests d'endotoxines des phages Aci (section 4.2).

Pour assurer l'élimination complète des phages suite à des essais *in vivo* (en environnement contrôlé et en milieu hospitalier), il est important de tester la sensibilité des phages envers différents désinfectants utilisés en hôpital. Quatre désinfectants sont efficaces pour inactiver complètement les phages SaA, le Virkon 1%, le Virox, l'Accel TB 50% ou le Javex 1,2%. Pour des essais où il serait éventuellement pertinent d'éliminer les bactéries sans inactiver les phages

(décontamination de surface), le phenosept 0,7%, le Dynakil 0,4% ou le AIRX44 1,6% pourraient être utilisés car ils n'ont pas ou n'ont que très peu d'effets sur les phages mais inactivent complètement les bactéries. (Tableau XVIII)

Pour déterminer le pouvoir d'élimination bactérienne du phage, l'efficacité *in vitro*, ou efficacité de lyse en milieu liquide, est réalisée. Lié aux caractéristiques d'infection du phage, ce test permet d'extrapoler l'efficacité *in vivo* du phage. Les résultats obtenus pour nos 7 phages sont très encourageants, particulièrement pour les phages BP16 qui réussit à éliminer complètement la bactérie, car après plus de 72 jours d'incubation à température pièce, la densité optique de la préparation est encore nulle et BP17 qui maintient un taux de bactéries très bas pendant plus de 5 jours à 37°C et 45 jours à température pièce. Ce serait donc d'excellents candidats pour des tests antibactériens thérapeutiques et une seule dose serait probablement suffisante pour éliminer la bactérie cible. Leur utilisation en décontamination à température pièce pourrait aussi s'avérer très efficace étant donné qu'on observe très peu ou pas de résistance bactérienne. Les autres phages, mis à part BP14, se montrent efficaces pendant plus de 24h en moyenne, ce qui peut s'avérer suffisant pour la « désinfection phagique » sur des surfaces. Le phage K utilisé dans une étude sur le SARM montre des résultats similaires à 37°C. *In vitro*, il réussit à éliminer complètement la bactérie en 2h et maintient ce niveau jusqu'à 25h (O'Flaherty et al, 2005). Le test d'efficacité *in vitro* est l'étape de sélection finale pour le choix des meilleurs candidats qui seront retenus pour les études *in vivo*. À la lumière de ces résultats, le choix se porte d'abord sur BP16 et BP17, puis BP18 et/ou BP19 utilisés individuellement ou éventuellement en cocktail.

La comparaison des résultats obtenus avec ce qui a déjà été publié s'avère difficile étant donné que les phages utilisés en thérapie ont tous été caractérisés différemment. Leur efficacité a souvent été évaluée directement *in vivo* par exemple, par le taux de survie des animaux, les comptes bactériens dans différents organes (Kumari, 2008) ou les symptômes apparents de la maladie comme la taille des abcès causés par l'infection bactérienne (Wills, 2005). Les critères de sélection des bactériophages sont aussi très variables d'une étude à l'autre. Les phages peuvent être sélectionnés selon leur persistance dans la circulation sanguine des animaux (Capparelli et al., 2008). Ainsi, il a été démontré que le phage M^{sa} contre *Staphylococcus aureus*, peut persister 21 jours dans la circulation des souris. Dans un autre cas, ce sont l'absence de gène de toxines connues ou de résistance aux antibiotiques combiné à un large spectre d'hôte qui justifient le choix des phages à l'étude (Matsuzaki et al., 2003). Finalement, dans la plupart des études rapportées, la caractérisation des phages est sommaire. Leur efficacité se mesure directement *in vivo*, chez les animaux. Ce projet de recherche vise donc à combler cette lacune. Il permettra dans un premier temps de démontrer *in vitro* l'option efficace et sécuritaire que représentent les phages bien caractérisés contre le SARM et *Acinetobacter baumannii* avant d'entreprendre des études *in vivo*.

4.2 *Acinetobacter baumannii*

Les phages Aci ont subi le même processus de sélection que les phages SaA. 2 des 11 phages de départ isolés ont été éliminés dès le début car ils ne lysaient pas la bactérie cible *Acinetobacter baumannii*. Les 9 autres phages ont été amplifiés avec succès, atteignant tous un titre au delà de 10^8 ufp/ml.

L'analyse des profils de digestion enzymatique sur gel d'électrophorèse a permis de mettre en évidence la présence de profils semblables. Suite à cette étape, les 3 phages Aci différents ont été caractérisés : BP20, BP21 et BP22.

La digestion enzymatique par différentes enzymes de restriction a confirmé que les 3 phages présentaient bien des profils différents. La taille de leur génome composé d'ADN double brins a été évaluée à 42 kb pour les 3 phages.

Les tests de spécificité ont démontré que ces 3 phages sont spécifiques à *Acinetobacter baumannii*. Ils ne lysent aucune autre souche d'*Acinetobacter* sp., aucun autre genre de bactérie, ni aucune souche non pathogène (Tableau XI). Leur spectre d'action se limite à la bactérie hôte avec laquelle ils ont été isolés, ce qui peut en limiter l'utilisation tant au niveau décontamination que thérapeutique.

Le test d'adhésion a permis de démontrer que les phages BP20 et BP22 prennent un peu plus de temps que BP21 pour adhérer à leur hôte. Pour ces 2 phages un temps de contact minimal entre le phage et la bactérie hôte de 15 min est recommandé afin d'obtenir une bonne amplification tandis que BP21 ne nécessite que 7 min de contact préalable (Tableau XII).

L'étude de la cinétique de répllication a permis de constater que les 3 phages s'amplifient rapidement à un faible MOI tout comme les phages SaA.

Cependant, ils n'atteignent pas un titre aussi élevé (Figure 9). Lors de la production à plus grande échelle, les rendements devraient être améliorés en testant d'autres MOI au préalable pour le ou les candidats retenus.

La stabilité des 3 phages Aci a été testée à 37°C et à RT en tampon SM ainsi qu'à 4°C en milieu LB et tampon SM. À 37°C, le phage BP20 est stable 1 semaine tandis que le titre de BP21 et BP22 reste constant pendant au moins 2 semaines. À 4°C en milieu LB ou SM ainsi qu'à RT, les trois phages sont stables au moins 3 mois. Ces résultats laissent supposer une bonne stabilité à long terme de ces phages (Tableau XVI).

Tout comme les phages SaA, ces 3 phages sont susceptibles à l'AccelTB 50% ainsi qu'à la Javex 1,2%, facilitant ainsi leur inactivation lors d'études *in vivo* (Tableau XVIII). Ils peuvent aussi être utilisés conjointement au phenosept 0,7%, Dynakil 0,4% ou au AIRX44 1,6% lorsque le maintien des phages actifs est souhaité en éliminant sélectivement les bactéries.

La purification a été faite par centrifugation à 48 000 g avec des pourcentages de récupération se situant entre 42 et 82% (Tableau XIV). Le test de stérilité a permis de confirmer que ces préparations étaient exemptes de bactéries. Cependant, leur taux d'endotoxines s'est avéré très élevé, autant en purifiant par centrifugation que par TFF (Tableau XIX). Pour respecter les normes de la FDA, les préparations doivent renfermer moins de 0.25 EU/ml d'endotoxines. La filtration tangentielle semble nettement moins efficace pour éliminer les endotoxines de la préparation de phages que la centrifugation à 48 000 g, cette technique semble plutôt les concentrer. En utilisant deux cassettes de différentes tailles à la suite l'une de l'autre, il serait peut-être possible

d'obtenir de meilleurs taux. Sinon, il faudra utiliser des techniques spécifiques d'élimination d'endotoxines. Il est évident que pour utiliser ces préparations, des techniques spécifiques d'élimination d'endotoxines ou d'autres techniques de purification devront être mises à profit.

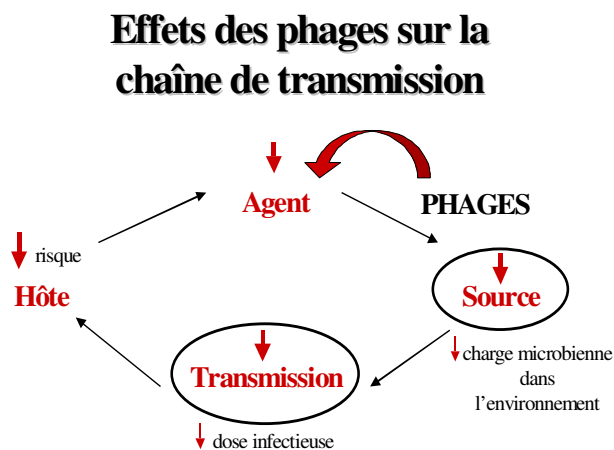
Quant à leur efficacité *in vitro*, BP20, BP21 et BP22 montrent une efficacité de lyse en milieu liquide identique : ils sont tous aptes à maintenir un niveau de bactérie quasi nul pendant 6 h à 37°C et pendant 8-9 h à température ambiante. Après ce temps, la bactérie devient capable de se répliquer à un rythme presque normal et la densité optique augmente rapidement (Tableau XX). Ce sont donc des candidats moins efficaces que les phages SaA qui sont très spécifiques mais pouvant tout de même être utilisés tant en décontamination de surface qu'en thérapie même si plusieurs applications/doses peuvent être nécessaires.

Ces résultats représentent une première étape face à la compréhension de la cinétique des phages et de leurs caractéristiques biologiques et génomiques. Il reste à savoir si ces phages qui semblent efficaces *in vitro* se comporteront de la même manière *in vivo*. Les prochaines étapes, qui ne feront pas partie de ce mémoire, seront donc d'abord, d'effectuer des tests d'efficacité en environnement contrôlé (réplique d'une chambre d'hôpital où tous les paramètres sont contrôlés) et ensuite de tester l'efficacité des phages en hôpital comme agent bactéricide spécifique suite à l'approbation de Santé Canada.

4.3 Applications visées

La transmission d'une infection nécessite la présence de quatre éléments : l'**agent** représenté par la bactérie cible, la **source** qui peut être soit les porteurs sains (patients ou personnel), l'environnement et/ou les instruments liés aux soins (pose d'un cathéter, sonde, etc.), le **mode de transmission** par contact direct ou indirect et l'**hôte** qui est plus ou moins sensible à l'infection en raison de son âge, son état de santé, l'état de son système immunitaire et en fonction des traitements qu'il reçoit. Ainsi, au sein de la chaîne de transmission, les bactériophages utilisés comme agents bactéricides sur les surfaces ou comme agents décolonisants, pourraient agir directement sur l'agent en diminuant la charge bactérienne, ce qui pourrait réduire la source en diminuant la charge microbienne dans l'environnement. Cette réduction de la charge bactérienne à la source permettrait d'atténuer et peut-être même d'éliminer la dose infectieuse transmissible au patient qui aurait ainsi moins de risque d'être contaminé (Figure 11).

Figure 11 : Effets potentiels des phages sur la chaîne de transmission des infections nosocomiales



En milieu hospitalier, trois catégories pouvant constituer un champ d'application potentiel pour l'usage de phages lytiques sont distinguées : l'environnement, la colonisation et l'infection.

Au problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques et aux désinfectants, s'ajoute celui de la persistance des bactéries nosocomiales sur les surfaces. L'usage des bactériophages par déposition sur des surfaces environnementales cliniques contaminées pour lyse spécifique directe des bactéries pourrait réduire significativement la transmission des infections nosocomiales tout en limitant l'impact sur les surfaces de travail, les instruments ainsi que sur les patients et le personnel hospitalier. C'est cet usage qui fera l'objet de nos premiers essais *in vivo*.

De plus, il serait possible d'utiliser les bactériophages en prévention ciblée, par l'inoculation de l'hôte en contact avec la bactérie. En absence de réplication virale active, cette approche « phagoprotectrice » nécessiterait probablement plusieurs doses de phages pour une protection durable. Même si l'inoculation à l'homme n'est pas un traitement direct de l'environnement, les excréctions humaines pourraient contribuer à répandre les phages dans l'environnement et ainsi permettre un meilleur contrôle naturel des pathogènes environnementaux.

Une autre approche préventive potentielle serait l'utilisation des phages pour décoloniser un hôte porteur de la bactérie opportuniste déjà identifiée. Cette approche permettrait d'obtenir une réplication virale au site colonisé entraînant une diminution de l'inoculum bactérien dans le but de bloquer la progression potentielle vers l'infection.

Comme il se fait déjà depuis longtemps en Georgie, les bactériophages pourraient aussi être utilisés pour le traitement des infections nosocomiales. Cette approche thérapeutique offrirait une alternative au traitement des infections causées par des bactéries devenues résistantes aux antibiotiques (traitement des infections locales, du système digestif, etc.). Cette méthode est relativement directe car l'objectif est de tuer directement la bactérie pathogène *in situ* en permettant au système immunitaire de l'hôte de reprendre le dessus.

4.4 Conclusion

L'ensemble de ce travail a permis de caractériser 7 phages contre SARM et 3 contre *Acinetobacter baumannii*. BP16, BP17, BP18 et BP19 s'avèrent être d'excellents candidats spécifiques aux SARM, stables à court ou moyen terme, sécuritaires et efficaces pour des études en environnement contrôlé puis en milieu hospitalier comme agents désinfectants dans le but de contribuer à la prévention et au contrôle des infections nosocomiales. Les trois phages Aci pourraient être utilisés pour les premiers tests *in vivo* mais force est de constater que leur trop grande spécificité envers une seule souche nous oblige à isoler et caractériser de nouveaux phages à plus large spectre d'*Acinetobacter baumannii* ou complémentaires.

En 2006, avec l'approbation de l'utilisation de bactériophages contre des agents pathogènes alimentaires par la FDA, la porte s'ouvrait sur un nouvel univers alimentaire « non chimique » qui reconnaissait le statut sécuritaire des phages. Quoique récente en Amérique, l'utilisation de phages contre des pathogènes spécifiques, tels *Salmonella* et *Listeria* est devenue une réalité du XXI^e siècle. Face aux infections nosocomiales, il faudrait oser franchir un pas de plus vers la thérapie phagique humaine. En prévention, le développement d'une nouvelle génération de bactéricides à base de phages apparaît comme étant une voie à exploiter.

La capacité des bactériophages de se répliquer exponentiellement aux sites d'infection et leurs milliards d'années de co-évolution avec les bactéries suggèrent fortement qu'ils pourraient jouer un rôle important dans notre armement face aux infections bactériennes et réussir là où les antibiotiques

échouent. La thérapie phagique ne se veut pas une technique remplaçant les antibiotiques, excepté dans des situations particulières, mais elle constitue un bon complément surtout lors de résistance aux antibiotiques.

Le monde étant actuellement confronté aux infections nosocomiales difficiles à traiter, les bactériophages représentent un potentiel médicinal naturel offrant une panoplie d'applications relativement peu coûteuses et qui répondent en toute sécurité aux impératifs de cette lutte antibactérienne en milieu hospitalier.

BIBLIOGRAPHIE

Abuladze, T., L. Manrong, M.Y. Menetrez, T. Dean et al. (2008). "Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7." Applied and Environmental Microbiology **Oct. 2008**: 6230-6238.

Adams, M.H. (1959). "Methods of study of bacterial viruses." In Bacteriophages Interscience Publishers, London, UK 447-448.

ADVIN "Association pour la défense des victimes d'infections nosocomiales." http://advin.org/component/option,com_frontpage/Itemid,135/.

Ahmad, S. I. (2001). "Treatment of post-burns bacterial infections by bacteriophages specifically ubiquitous *Pseudomonas* spp. notoriously resistant to antibiotics." Medical Hypothesis **58** (4): 327-331.

Alain, J. (2006). "Des virus dans votre assiette " Impact Campus Mardi 5 septembre 2006.

Al-Hamad, A., S. Maxwell (2008). "How clean is clean? Proposed methods for hospital cleaning assessment." Journal of Hospital Infection doi:10.1016/j.hin.2008.08.006: 1-7.

Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport, N. Troitsky (1998). "Bacteriophages show promise as antimicrobial." Journal of Infection **36**: 5-15.

ASPC "Fiche technique- Santé/Sécurité / Agence de la santé publique du Canada." <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds143f-fra.php>.

ASPC "Fiche technique-Santé/Sécurité-Matières infectieuses." <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/index-fra.php#s>.

Barrow, P. A. a. J. S. (1997). "Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential." Trends in microbiology **5**(7): 268-271.

Bergone-Bérézin, E. (1995). "The increasing significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents." Journal of Hospital Infection **30 (Supplement)**: 441-452.

Biswas, B., S. Adhya, P. Washart, B. Paul et al. (2002). "Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*." Infection and Immunity **70**(1): 204-210.

Blythe, D., D. Keenlyside, S.J. Dawson, A. Galloway (1998). "Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." Journal of Hospital Infection **38**: 67-70.

Bonten, M. J. M., R. Willems and R. A. Weinstein (2001). "Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?" The Lancet: Infectious Diseases **1**(December 2001): 314-325.

Canadienne, L. P. (2008). "Les infections nosocomiales en hausse au Canada." La Presse **8 novembre 2008**.

Capparelli, R., M. Parlato, G. Borriello, P. Salvatore, D. Iannelli (2007). "Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(8): 2765-2773.

Carrillo, C. L., R.J. Atterbury, A. El-Shibiny, P.L. Connerton et al. (2005). "Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens." Applied and Environmental Microbiology **Nov. 2005**: 6554-6563.

Cavallo, J. D., D. Hocquet , P. Plesiat , R. Fabre and M. Roussel-Delvallez (2007). "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials:2004 french multicentre hospital study." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **59**: 1021-1024.

Courchesne, H. (2004). "Les hôpitaux qui tuent." www.radio-canada.ca/actualité/enjeux/reportages/2004/040120.

Curtis, L. T. (2008). "Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions." Journal of Hospital Infection **69**: 204-219.

Dancer, S. J. (1999). "Mopping up hospital infection." Journal of Hospital Infection **43**: 85-100.

Dancer, S. J. (2009). "Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study". BMC Medicine **7**:28

Dettenkofer, M., S. Wenzler, S. Amthor et al. (2004). "Does disinfection of environmental surfaces influence nosocomial infection rates? A systematic review." AJIC **32**(2): 84-89.

Duckworth, D. H., P. A. Gulig (2002). "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections." Biodrugs **16**(1): 57-62.

Eckstein, B. C., D. Adams, E. C. Eckstein, A. Rao, A. K. Sethi, G. K. Yadavalli and C. J. Donskey (2007). "Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods." BMC Infectious Diseases **7**(61).

Enoch, D. A., C. Summers, N.M. Brown, L. Moore et al. (2008). "Investigation and management of an outbreak of multidrug-carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Cambridge, UK." Journal of Hospital Infection **70**: 109-118.

Faruque, S. M., M. J. Islam, Q.S. Ahamad et al. (2005). "Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: role of host-mediated amplification of phage." PNAS **102**(17): 6119-6124.

Faure, E. (2002). "Les infections nosocomiales." <http://www.caducee.net/dossierspecialises/infection/nosocomiales.asp>.

FDA (1987). "Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs." Biological Products, and Medical Devices. U.S. Department of Health and Human Services **Public Health Service**(December 1987).

Foster, T. J. (2004). "The *Staphylococcus aureus* "superbug"." The Journal of Clinical Investigation **114**(12): 1693-1696.

Gill, J.J., J.C. Pacan, M.E. Carson et al. (2006) "Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle." Antimicrobial agents and chemotherapy **50** (9): 2912-2918.

Gourdeau, M., C. Tremblay, C. Frenette (2005). "Impacts des infections nosocomiales et efficacité d'un programme de prévention." Montréal, 23 mars 2005, document non publié, présenté au Colloque sur la prévention des infections nosocomiales.

Graffunder, E., R. A. Venezia (2002). "Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**: 999-1005.

Henderson, D. K. (2006). "Managing methicillin-resistant staphylococci: A paradigm for preventing nosocomial transmission of resistant organisms." AJIC **34**(5 (Supplement 1)): S46-S54.

INSPQ (2006). Mesures de contrôle et de prévention des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) au Québec. C. s. l. i. n. d. Québec: 1-8.

INSPQ (2008). "Surveillance des diarrhées associées à *Clostridium difficile* au Québec." Direction risques biologiques, environnementaux et occupationnels Juin 2008(Bilan du 9 décembre 2007 au 31 mars 2008).

Janssen, K. (1995) "Current protocols in molecular biology" John Wiley and sons inc. Volume1.

Kramer, A., S. Ingegorg and G. Kampf (2006). "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systemic review." BMC Infectious Diseases **6**(130).

Kropinski, A. M. (2006). "Phage therapy - Everything old is new again." Can J Infect Dis Med Microbiol **17**(5): 297-306.

Kumari S., K. Harjai and S. Chhibber (2009) "Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*" J. Microbiol. Biotechnol. **19**(6): 622–628.

Kutter, E., A. Sulakvelidze (2005). Bacteriophages Biology and applications. Boca Raton.

Mahamat, A., F.M. MacKenzie, K. Brooker, D.L. Monnet et al. (2007). "Impact of infection control interventions and antibiotics use on hospital MRSA: a multivariate interrupted time-series analysis." Int Journal of Antimicrobial Agents **30**: 169-176.

Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, M. Kuroda et al. (2003). "Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage ϕ MR11." Journal of Infectious Diseases **187**: 613-624.

McBryde, E. S., L.C. Bradley, M. Whitby, D.L.S. McElwain (2004). "An investigation of contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Journal of Hospital Infection **58**: 104-108.

McVay, C., M. Velasquez and J.A. Fralick (2007). "Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(6): 1934-1938.

MEDIX "Cours de médecine." <http://www.medix.free.fr/sim/infection-nosocomiale-bacteriologie.php>.

Merabishvili M., J.P. Pirnay, G. Verbeken et al. (2009). "Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials." PlosOne **4** (3).

Merril, C. R., B. Biswas, R. Carlton et al. (1996). "Long circulating bacteriophage as antibacterial agents." Proc. Natl. Acad. Sci. USA(93): 3188-3192.

Merril, C. R., D. Scholl and S. L. Adhya (2003). "The prospect for bacteriophage therapy in western medicine." Nature Reviews **2** (June 2003): 489-497.

MIDISS"*Acinetobacter baumannii*." <http://www.infonosocomiale.fr/?P=Article&F=B2&R=28&RetV=ArchivesAFIB010>.

Miedzybrodzki, R., W. Fortuna, B. Weber-Dabrowska, A. Gorski (2007). "Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment." Postepy Hig Med Dosw. **61**: 461-465.

Mitsuda, T., K. Arai, M. Ibe, T. Imagawa et al. (1999). "The influence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers in a nursery and transmission of MRSA to their households." Journal of Hospital Infection **42**: 45-51.

Miyachi, H., H. Furuya, K. Umezawa, I. Yumiko et al. (2007). "Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by stepwise implementation of preventive strategies in a university hospital: impact of link-nurse system on the basis of multidisciplinary approaches." Am J Infect Control **35**: 115-121.

Montefour, K., J. Frieden, S. Hurst, C. Helmich et al. (2008). "*Acinetobacter baumannii*: An emerging multidrug-resistant pathogen in critical care." Critical Care Nurse **28**(1, February 2008): 15-25.

MSSS (2005). D'abord, ne pas nuire... Les infections nosocomiales au Québec, un problème majeur de santé, une priorité. D. d. communications. Québec, Santé et Services sociaux Québec: 8-25.

MSSS (2008). "Le Québec et les infections nosocomiales " http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/prob_sante/nosocomiales/index.php?situation.

Murray "Bacteriophage." Medical microbiology **3rd ed**(Chap 5): <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>.

Muto, C. A., J.A. Jernigan, B.E. Ostrowsky, H.M. Richet et al. (2003). "SHEA Guidelines for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*." Infection control and hospital epidemiology **24**: 362-386.

O'Flaherty, S., R.P. Ross, W. Meaney, G.F. Fitzgerald et al. (2005). "Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant Staphylococci from hospitals." Applied and Environmental Microbiology **71**(4): 1836-1842.

Patwardhan R.B., P.K. Dhakephalkar, K.B. Niphadkar et al. (2008) " A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids." Indian Jof Med Res **128**: 178-187.

Pearce, H., S. Messenger and J.-Y. Maillard (1999). "Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*." Journal of Hospital Infection **43**: 101-107.

Pirisi, A. (2000). "Phage therapy - advantages over antibiotics?" The Lancet **356** (October 21,2000): 1418.

Prescott, L., J.P. Harley, D.A. Klein (1995) "Microbiologie." De Boeck Université, Bruxelles, 711-712.

Projan, S. (2004). "Phage offer a real alternative." Nature Biotechnology **22**(5): 505-507.

Rampling, A., S. Wiseman, L. Davis, A.P. Hyett, et al. (2001). "Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Journal of Hospital Infection **49**: 109-116.

Resch, G. a. J. M. (2002). "Les bactériophages, nouvelle perspective dans le traitement des maladies infectieuses?" Rev Mens Suisse Odontostomatol. **112**(6): 643-644.

Rodriguez-Bano, C. J. M. a. J. (2002). "Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment." Clinical Microbiology and Infection **8**(11, November 2002): 687-693.

Rosner, A. J., D.L. Becker, A.H. Wong, E. Miller, J.M. Conly (2004). "The costs and consequences of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection treatments in Canada." Can J Infect Dis Med Microbiol **15**(4 (July/August 2004)): 213-220.

Russell, A. D., U. Tattawasart, J.Y. Maillard, J.R. Furr (1998). "Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides." Antimicrobial agents and chemotherapy **42**(8): 2151.

Schentag, J. J., J.M. Hyatt, J.R. Carr et al. (1998). "Genesis of MRSA. How treatment of MRSA infections has selected for vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and the importance of antibiotic management and infection control." Clinical Infections Diseases **26**: 1204-1214.

Sheng H., H. J. K., I.T. Kudva et al. (2006). "Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants." Applied and Environmental Microbiology **72**(8): 5359-5366.

Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J.G. Morris Jr. (2001). "Bacteriophage therapy." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(3): 649-659.

Tacconelli, E., M.A. Cataldo (2008). "Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control." Int Journal of Antimicrobial Agents **31**: 99-106.

Tacconelli, E., G.D. Angelis, M.A. Cataldo et al. (2008). "Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **61**: 26-38.

Vallée, P. (2007). La "gangrène hospitalière" sévit toujours-L'adoption de simples mesures d'hygiène garantirait au réseau hospitalier des économies de 2 milliards par année, www.ledevoir.com/2007/11/10/163651.html.

Vulgaris-Médical "Pseudomonas aeruginosa." <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/pseudomonas-aeruginosa-3873.html>.

Weinstein, R. A. (1998). "Nosocomial infection update." Emerg Infect Dis Jul-Sep **4**(3): 416-420.

Wendt, C., B. Dietze, E. Dietz and H. Ruden (1997). "Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces." Journal of Clinical Microbiology **35**(6): 1394-1397.

Wenzel, R. P. (2007). "Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century." Clinical Infections Diseases **45**(Suppl 1): S85-S88.

Wills, Q. F., C. Kerrigan and J. Soothill (2005). "Experimental bacteriophages protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(3): 1220-1221.

Wisplinghoff, H., R. Schimtt, A. Wöhrmann et al. (2007). "Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*." Journal of Hospital Infection **66**: 174-181.

Zimecki M., J. Artym, M. Kocieba et al. (2009). "Effects of prophylactic administration of bacteriophages to immunosuppressed mice infected with *Staphylococcus aureus*." BMC Microbiology **9**(169)

Zoutman, D. E., B. Douglas Ford (2008). "A comparison of infection control program resources, activities, and antibiotic resistant organism rates in Canadian acute care hospitals in 1999 and 2005: Pre- and post-severe acute respiratory syndrome." AJIC **36**(10): 711-717.