

# Contribution des bactériophages à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement

Michel GAUTIER | michel.gautier@agrocampus-ouest.fr

Agrocampus Ouest-Inra - UMR STLO - Rennes

Mots clés : ARG, bactériophage, gène de résistance aux antibiotiques, transferts horizontaux

Les bactériophages sont probablement les microorganismes les plus abondants sur la terre : on estime leur nombre à  $10^{31}$ , soit dix fois plus que le nombre de bactéries. Jusqu'à une date très récente, les études de métagénomique\*, visant à évaluer la biodiversité des écosystèmes microbiens complexes, ne les prenaient pas spécifiquement en compte. Compte tenu de l'omniprésence des phages et de leurs relations étroites avec les bactéries, il était important de connaître leur contribution à la diffusion de ces gènes. Les trois publications analysées ici visent à évaluer le type et la fréquence des gènes codant des résistances aux antibiotiques dans des populations phagiques issues de diverses niches écologiques. La première publication met toutefois l'accent sur la méthodologie qui doit être mise en oeuvre pour l'obtention de résultats fiables. Ces travaux permettent aussi d'avancer des hypothèses quant au rôle des bactériophages dans la diffusion de ces résistances.

## Les bactériophages codent rarement des gènes de résistances aux antibiotiques : un appel à la prudence pour l'analyse des viromes

Enault F. et al. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. ISME J. vol.11(1): p.237-247

### Résumé

L'objectif d'une partie de ce travail a été d'évaluer la part des gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs\*) portée par les génomes des bactériophages. Les génomes de 1181 phages d'origine très diverse, séquencés et publiés, ont été analysés. En utilisant les seuils de similarité\* utilisés habituellement pour ce type d'expérimentation, plus de 400 gènes de résistance putatifs ont ainsi été mis en évidence. Afin d'éliminer ceux qui ne codaient pas des résistances mais qui présentaient simplement une homologie avec ceux-ci, les auteurs ont utilisé des seuils de similarité de plus en plus stricts pour n'aboutir au final qu'à quatre gènes de résistance putatifs\*. Afin de vérifier la fonction de ces gènes, ceux-ci ont été clonés chez *E. coli* : il s'est avéré qu'ils ne conféraient pas de résistance aux antibiotiques à cette bactérie et codaient fort probablement pour des protéines de la queue des phages. Ensuite, en utilisant le seuil de similarité le plus sévère défini précédemment, 25 viromes\* de différentes origines (fèces humain, fèces de souris avant et après traitement aux antibiotiques, poumons de patients atteints ou non de la mucoviscidose) ont été analysés. Dans la plupart des viromes, la fréquence des gènes de résistance aux antibiotiques ne s'est pas révélée différente de celle obtenus sur les 1181 phages. Elle était cependant d'autant plus élevée que les viromes étaient contaminés par de

l'ADN bactérien. Ce travail démontre que, d'une part les bactériophages portent très rarement sur leurs génomes des gènes de résistance aux antibiotiques et que, d'autre part, les gènes de résistance aux antibiotiques identifiés dans les viromes proviennent probablement d'ADN bactérien véhiculé par transduction généralisée\*.

### Commentaire

Lors de l'infection bactérienne, certains bactériophages sont capables de transférer à la cellule infectée, des gènes bactériens intégrés sur leur génome (par capture\* de gène ou par transduction spécialisée\*) ou des gènes uniquement bactériens, encapsidés\* par erreur dans la tête du phage (transduction généralisée\*). Dans ce deuxième cas, la fréquence de transfert est plus faible que dans le premier, car seule une très faible fraction des particules de la population phagique est concernée (1). Des travaux antérieurs basés sur l'analyse des viromes suggéraient que l'intégration des gènes de résistance aux antibiotiques sur le génome des phages est relativement fréquente (2-3) : une telle hypothèse suggérait un rôle important des phages dans la dissémination des ARGs. Or, les travaux décrits ici démontrent le contraire. La solidité de ce travail repose, d'une part sur le choix de bases de données pertinentes car elles recensent les gènes de résistance aux antibiotiques bien annotés et identifiés et d'autre part en prenant en compte un seuil de similarité élevé. Cette méthodologie conduit à éliminer de nombreux gènes présentant une forte similarité aux ARGs sans pour cela conférer de résistance. Il met ainsi les lecteurs en garde sur les travaux visant à évaluer, par les méthodes de métagénomique\*, la présence des ARGs dans l'environnement, qu'ils soient d'ailleurs d'origine phagique ou bactérienne : les cribles de sélection de gènes doivent être analysés et critiqués.

## Avancées sur la contribution des bactériophages à la résistance bactérienne aux antibiotiques

Lekunberri I. et al. (2017). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environmental pollution*, vol. 220: p.981-984

### Résumé

Ce travail a visé à évaluer la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans 33 viromes provenant d'environnements variés : selles humaines, fèces de porc, eaux usées, eaux douces et eaux de mer. Les séquences de ces viromes ont été comparées à plusieurs banques de données de manière à identifier des gènes de résistance aux antibiotiques. Les résultats montrent que les bactériophages provenant de selles humaines sont peu porteurs de gènes de résistance (0,003% des séquences) tandis que ceux provenant de fèces de porcs l'étaient beaucoup plus (de 0,04% à 0,45%). Les échantillons fécaux de porc sont aussi ceux où les viromes ont conservé une plus grande quantité d'ADN bactérien, ce qui suggère une forte fréquence de transduction généralisée (ou de contamination de l'échantillon par de l'ADN exogène). Les viromes provenant des eaux usées et de l'eau douce étaient caractérisés par la plus grande diversité des ARGs et une quantité nettement plus élevée de ces gènes que dans les viromes provenant des selles humaines. Enfin, l'assemblage des contigs\* a permis de démontrer que deux gènes de résistance étaient probablement intégrés dans le génome de deux phages.

### Commentaire

Les résultats obtenus sont intéressants car ils montrent que certains milieux écologiques (ici les fèces de porc) dont on présume qu'ils sont en contact avec des antibiotiques, contiennent des bactériophages portant des ARGs : ces gènes sont ensuite véhiculés par l'eau puisqu'on les trouve ici dans les eaux usées, l'eau douce et l'eau de mer. Des travaux antérieurs de cette équipe ont montré aussi une forte prévalence de ces gènes dans des bactériophages issus d'eaux usées provenant d'hôpitaux (4-5). Le choix des bases de données ainsi que le seuil de similarité pour la détection de ces gènes sont pertinents. D'ailleurs, ces travaux confortent aussi ceux de Esnault *et al* (publication n°1) qui ont montré dans les selles humaines, un pourcentage similaire d'ARGs véhiculés par les phages, ainsi qu'une faible prévalence de ces gènes. Deux gènes de résistance, intégrés par capture, ont été mis en évidence dans deux génomes phagiques mais il est fort probable que ces phages portant ces gènes soient défectifs\*. Ces travaux apportent des éléments à la compréhension de la diffusion horizontale des ARGs dans des niches écologiques microbiennes complexes. Ils mettent notamment en exergue le fait que si la transduction généralisée est connue depuis longtemps, son importance dans les transferts horizontaux des gènes bactériens a été jusqu'à présent sous-estimée.

## Abondance des gènes de résistance aux antibiotiques dans les bactériophages de l'environnement

Anand T. et al. (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *Journal of General virology*, vol.97: p.3458-3466

### Résumé

Le but de ce travail était de rechercher par PCR\* des ARGs dans des bactériophages amplifiés *in vitro* et initialement isolés à partir de l'environnement de plusieurs élevages, intensifs ou non : eaux usées, fumiers, litières, eaux de rivière. A partir de ces échantillons, des isolats bactériens cultivables ont également été obtenus, puis identifiés. Des bactériophages actifs sur ces souches, mais aussi sur d'autres souches provenant d'une collection d'origine vétérinaire (NCCTCC\*) ont ainsi pu être recherchés et amplifiés dans ces mêmes prélèvements. Au final, 55 bactériophages actifs sur 17 genres bactériens ont pu ainsi être isolés, amplifiés, purifiés et étudiés. Quatre gènes de résistance aux antibiotiques (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>, *tetA* et *tetW*) ainsi que trois gènes codant des intégrases\* (*int1*, *int2* et *int3*) ont été recherchés par PCR sur l'ADN extrait de chaque phage. La présence de ces deux catégories de gènes a été constatée dans 61,8 % de ces ADN phagiques. *bla*<sub>TEM</sub> (17/55) et *int1* (6/55) étaient les gènes les plus rencontrés et prédominaient dans les phages provenant d'élevages intensifs, notamment dans les sols, les eaux usées et les litières. *TetA*, le second gène de résistance le plus souvent rencontré (7/55), était prédominant dans les eaux.

Les phages provenant d'élevages intensifs présentaient une plus grande diversité de gènes de résistance que ceux provenant d'élevages moins intensifs. Ces travaux montrent l'importance de la transmission des résistances aux antibiotiques via la transduction généralisée. Les auteurs précisent que, bien que leurs résultats ne permettent pas de déterminer si les gènes sont portés par le génome des phages ou sont seulement véhiculés par transduction généralisée, cette dernière voie leur semble plus probable.

### Commentaire

La majorité des travaux récents visant à évaluer le portage de gènes de résistance aux antibiotiques par les bactériophages, repose essentiellement sur la recherche de ces gènes dans des communautés microbiennes dont on a extrait l'ADN phagique total (virome) (6). Les principales faiblesses de cette méthode sont la possible contamination par de l'ADN bactérien (libre ou encapsidé par les phages), la difficulté à attribuer à un bactériophage donné une ou plusieurs résistances ainsi que la surestimation du nombre de ARGs (publication n°1). Ici, pour éviter une partie de ces écueils, les auteurs ont adopté une autre démarche puisqu'ils ont recherché ces gènes dans des particules phagiques amplifiées puis purifiées provenant de divers prélèvements et actifs en partie, sur des bactéries issues de ces prélèvements. L'approche par PCR permet d'accéder à une profondeur d'analyse inégalée dans les analyses de viromes, et de déceler les particules transductrices sous-dominantes, produites par un phage donné. De plus, afin

d'éviter les erreurs de détection dues à l'utilisation de bases de données exhaustives mais peu précises et ciblant la majorité des gènes de résistance connus, ils ont choisi délibérément de se focaliser sur certains gènes de résistance pertinents et bien caractérisés: les résistances aux beta-lactamines et aux tétracyclines. Pour estimer la possibilité qu'auraient ces gènes de résistance, véhiculés par transduction généralisée, d'être transférés à d'autres bactéries, ils ont aussi recherché les gènes codant les intégrases bactériennes les plus répandues. Une approche par qPCR\* aurait cependant permis d'accéder à une évaluation quantitative de la contribution des bactériophages à la diffusion de gènes de résistance.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces travaux montrent que la fréquence des ARGs intégrés sur les génomes phagiques est très faible et que, par conséquent, la transduction spécialisée et la capture de gènes sont fort probablement peu impliquées dans les transferts horizontaux de ces résistances. En revanche, ils montrent que la transduction généralisée n'est pas à négliger. Cette constatation est très importante car, en ce qui concerne le maintien et la propagation à la descendance des ARGs transférés dans la cellule bactérienne, ce mécanisme est probablement le moins performant : en effet il nécessite que la particule virale portant la même spécificité que le phage originel trouve une bactérie permissive (fixation virale et injection de l'ARGs), qu'une intégration de l'ARGs dans le génome bactérien puisse se réaliser (recombinaison homologue, intégrons) et enfin que la bactérie receveuse de ce transfert génétique ne soit pas lysée par d'autres phages lytiques environnants (notamment les particules virales fonctionnelles). Ces travaux montrent aussi que les méthodes de criblage utilisées pour la détection des gènes de résistances aux antibiotiques dans des écosystèmes complexes peuvent engendrer de nombreux faux positifs. Les bases de données utilisées et les seuils d'homologie employés pour les exploiter sont des paramètres essentiels à la validité de cette détection. Quoiqu'il en soit, les résultats analysés ici vont dans le sens de nombreux autres montrant que les ARGs sont plus fréquemment rencontrés dans les milieux contaminés par les antibiotiques. Si les mécanismes d'acquisition horizontale d'ADN par les bactéries sont connus depuis longtemps, leur fréquence et leur part relative dans les niches écologiques complexes est plus difficile à évaluer. Bien qu'il soit depuis longtemps connu que les phages participent à l'évolution des bactéries, la part liée à la transduction (qu'elle soit généralisée ou spécialisée) et à la capture de gène est peu renseignée. L'utilisation potentielle à grande échelle des bactériophages pour lutter contre les bactéries pathogènes, que ce soit en usage vétérinaire, en médecine humaine ou en industrie agroalimentaire, impose de mieux connaître les risques liés aux transferts génétiques horizontaux impliquant ces microorganismes. Enfin, d'un point de vue plus global, les mécanismes de transfert horizontal d'ADN se produisant dans les niches écologiques complexes, méritent d'être plus investigués, notamment pour une meilleure maîtrise du risque de dissémination de l'ADN provenant des organismes génétiquement modifiés.

## GENERAL CONCLUSION

*These works show that the frequency of integration of antibiotic resistant genes (ARGs) inside the genome of phages is probably very low. Specialized transduction and gene capture are probably not involved in the horizontal transfer of these resistances. On the other hand, they show that generalized transduction should not be overlooked. This observation is very important because, with regard to the maintenance of ARGs transferred to the bacterial cell, this mechanism is probably the least efficient: it requires the presence of genetic elements associated with the ARGs (homologous genes or integrons) allowing the insertion into the bacterial genome. These works also show that the screening methods used for the detection of ARGs in bacterial ecosystems can generate many false positives. The choice of the databases and the homology thresholds used to exploit these databases are essential parameters for the validity of this detection. Nevertheless, the results analyzed here are in agreement with many others showing that ARGs are more commonly encountered in antibiotic-contaminated environments. Although the mechanisms of acquisition of horizontal DNA by bacteria have been known for a long time, their frequency and relative share in the bacterial ecological niches, where these bacteria evolve, is more difficult to assess. Although it has long been known that phages are involved in the evolution of bacteria, the share of transduction (generalized or specialized) and gene capture are poorly documented. The potential large-scale use of bacteriophages to control pathogenic bacteria, in veterinary and human therapy or in the agro-food industry, requires a better understanding of the risks associated with horizontal genetic transfers involving these microorganisms. Finally, from a more general point of view, the mechanisms of horizontal transfer of DNA occurring in complex ecological niches must be investigated, in order to help better controlling the risk of dissemination of DNA from genetically modified organisms.*

## Lexique

**Antibiotic Résistance Gene (ARG)** : Gène codant une résistance aux antibiotiques.

**Bactériophage ou phage** : Virus infectant les bactéries, en général à ADN double brin, possédant une queue, une tête allongée ou isométrique.

**Capture de gène** : Il arrive que l'ADN phagique se recombine avec des séquences homologues présentes sur le chromosome bactérien (des séquences issues de prophages proches le plus souvent). Si ces séquences homologues encadrent un ou plusieurs gènes bactériens, ceux-ci seront intégrés lors de la recombinaison sur l'ADN du phage : on parle alors de capture de gène(s) par les phages.

**Contigs** : Séquence génomique générée par l'assemblage de plusieurs fragments séquencés qui se chevauchent.

**Défectif** : Se dit d'un bactériophage qui a perdu certaines fonctions et qui a besoin de celles d'un autre phage pour se multiplier.

**Encapsidé** : État de l'ADN (phagique ou bactérien) lorsqu'il est emballé dans la tête (ou capsid) du phage

**Intégrase (bactérienne)** : Enzyme qui intervient dans l'insertion et l'excision des intégrons. Ceux-ci sont des éléments génétiques bactériens, qui permettent la capture, l'expression et la dissémination de gènes. Ils sont notamment impliqués dans la multi-résistance des bactéries aux antibiotiques.

**Métagénomique** : Étude globale de la séquence des gènes d'un écosystème.

**NCCTCC** : National Center for Veterinary Type Culture Collection.

**PCR** : Technique permettant d'amplifier un segment d'ADN de manière à pouvoir le détecter.

**PCRq** : Technique permettant d'amplifier un segment d'ADN de manière à pouvoir le détecter et le quantifier.

**Phagothérapie** : Utilisation des bactériophages pour tuer spécifiquement un ensemble de souches appartenant à une espèce bactérienne ciblée.

**Putatif (gène)** : Les gènes putatifs sont des séquences d'ADN considérées comme étant des gènes, mais dont on ne connaît ni la fonction, ni le produit.

**Seuil de similarité** : Niveau de similarité utilisé lors de l'analyse des séquences pour détecter des ressemblances probantes entre deux gènes.

**Transduction spécialisée** : Certains phages s'intègrent au génome bactérien et y demeurent à l'état silencieux. Pour se répliquer, leur génome s'excise du génome bactérien. Un fragment du génome de la bactérie peut être embarqué, soit un ou plusieurs gènes.

**Transduction généralisée** : Capacité de certains phages à emballer aléatoirement, à la place de leur propre ADN, des fragments d'ADN bactérien puis de les délivrer par la suite à des bactéries permissives. Dans ce cas, la répliquon du phage n'est plus possible, car son génome n'est plus présent.

**Transferts génétiques horizontaux** : Transferts génétiques se produisant entre plusieurs individus (ici des bactéries) différents. Il s'agit de la conjugaison bactérienne, la transformation et la transduction (spécialisée ou généralisée).

**Virome** : Ensemble des génomes viraux provenant d'une niche écologique spécifique.

## Publications de référence

**1 Volkova VV, Lu Z, Besser T, Grohn YT.** Modeling the infection dynamics of bacteriophages in enteric *Escherichia coli*: estimating the contribution of transduction to antimicrobial gene spread. *Appl Environ Microbiol* 2014; (80): 4350–4362.

**2 Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ.** Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 2013; (499): 219–222.

**3 Rolain JM, Fancello L, Desnues C, Raoult D.** Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2011; (66): 2444–2447.

**4 Subirats, J., Sanchez-Melsio, A., Borrego, C.M., Balcazar, J.L., Simonet, P.,.** Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2016; (48), 163-167

**5 Marti, E., Variatza, E. & Balcazar, J. L.** Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum b-lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin Microbiol Infect* 2014; (20): 456–459

**6 Calero-Caceres, W. & Muniesa, M.** Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res* 2016; (95):11–18

### Revues de la littérature

**Dos Santos DF, Istvan P, Quirino BF, Kruger RH.** Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments. *Microb Ecol.* 2017 73(2):479-491.

**Koonin EV.** Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Res.* 2016; 25;5.

**Luby E, Ibekwe AM, Zilles J, Pruden A.** Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *J Environ Qual.* 2016 45 (2):441-53.

**Pamar KM, hathi ZJ, Dafale NA.** Control of multidrug-resistant gene flow in the environment through bacteriophage intervention. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017; (181): 1007–1029

**Von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF.** Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2016;19;7:173.

### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.