

R I C A I

Les phages véhiculent des gènes de résistance aux antibiotiques: mythe ou réalité?

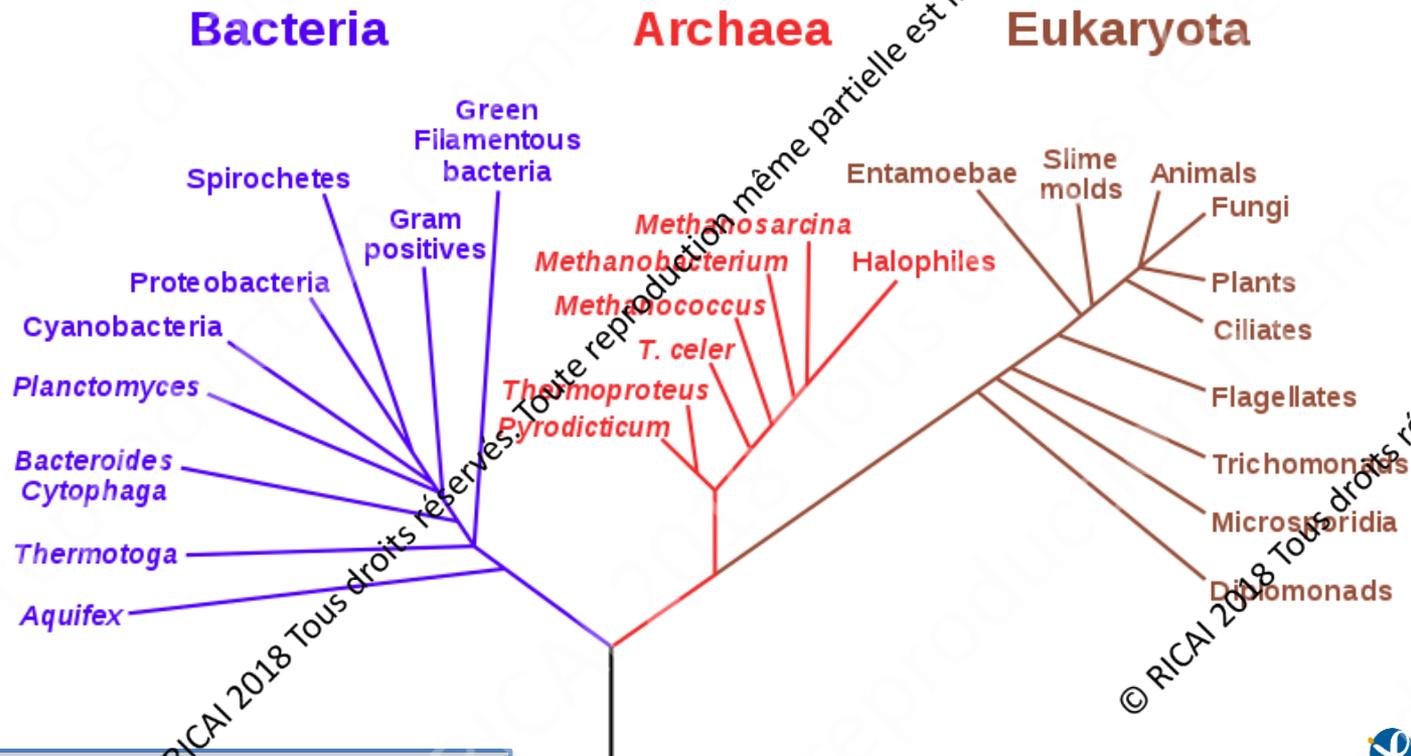
Camille d'Humières

PHU – Bactériologie, Hôpital Bichat, Paris

Etudiante en thèse – E. Rocha (I. Pasteur)/E. Denamur (IAME)

Les phages ?

Arbre phylogénétique de la vie



Woese et al. (1990)

Les phages ?

Arbre phylogénétique de la vie

Virus

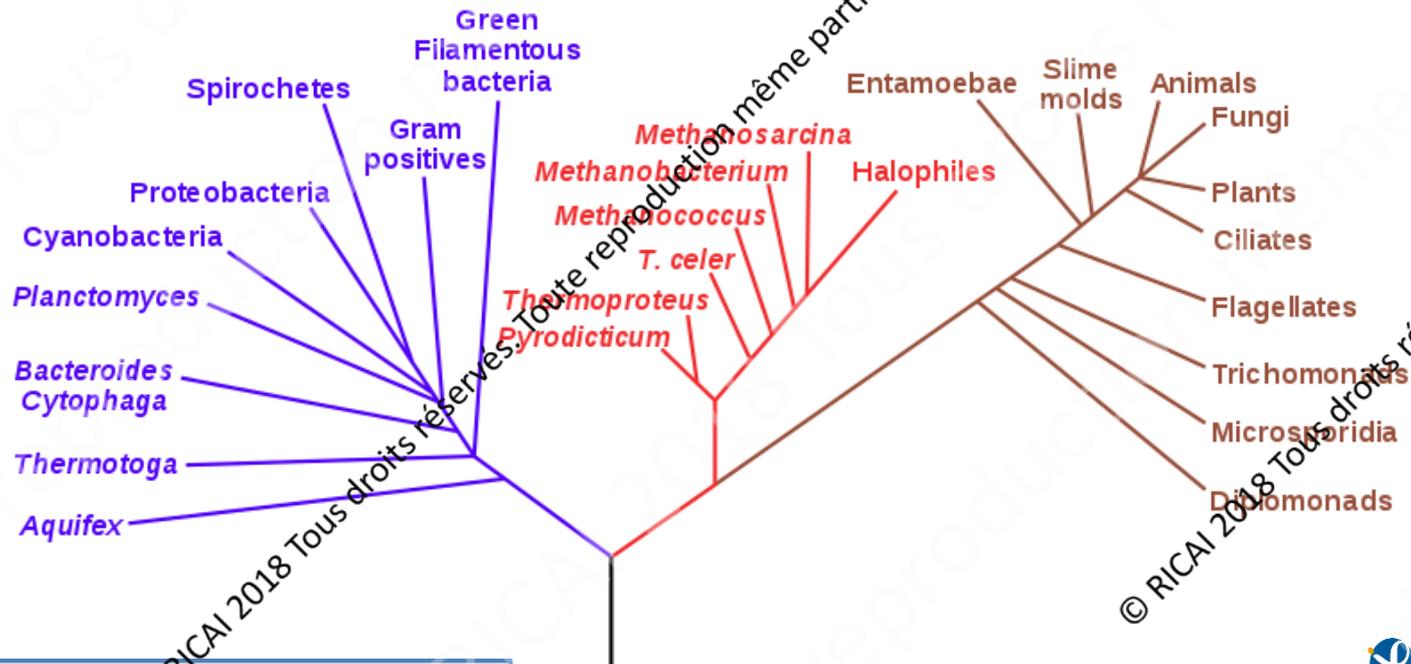
Phage

Virus eucaryote

Bacteria

Archaea

Eukaryota



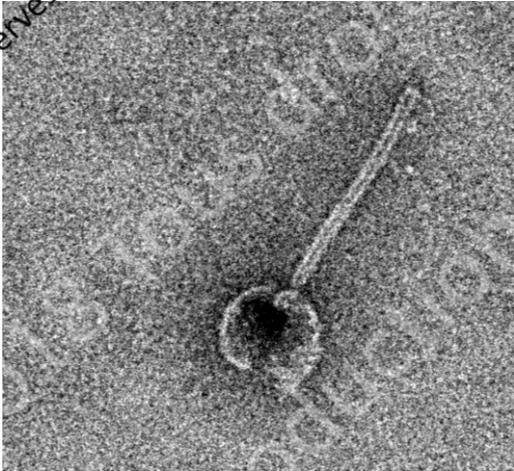
Woese et al. (1990)

Les phages ?

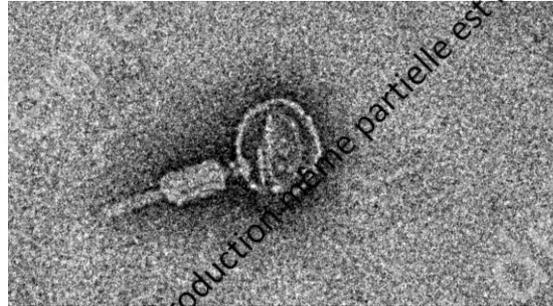
- Entité biologique la plus **abondante** sur la planète (10^{31})
- **Spécifique** d'une espèce/souche
- Très efficace pour **tuer** l'hôte
- Rôle important dans la **dynamique** des populations bactériennes
- Renaissance de l'intérêt des phages dans des environnements riches en bactéries
 - ✓ océans
 - ✓ sol
 - ✓ sédiments
 - ✓ chez l'Homme, dans l'intestin

Les phages ?

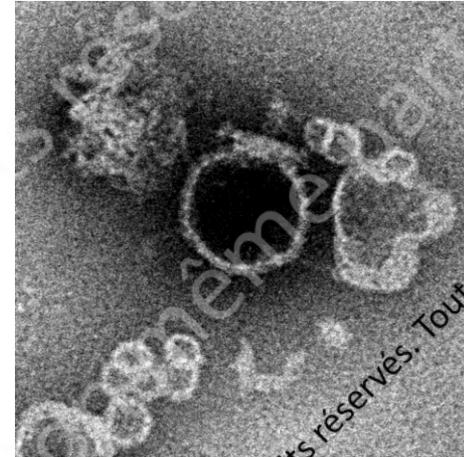
- Phages à **ARN**
- Phages à **ADN** (simple brin, **double brin**)
- 25-200 nm



Siphoviridae



Myoviridae



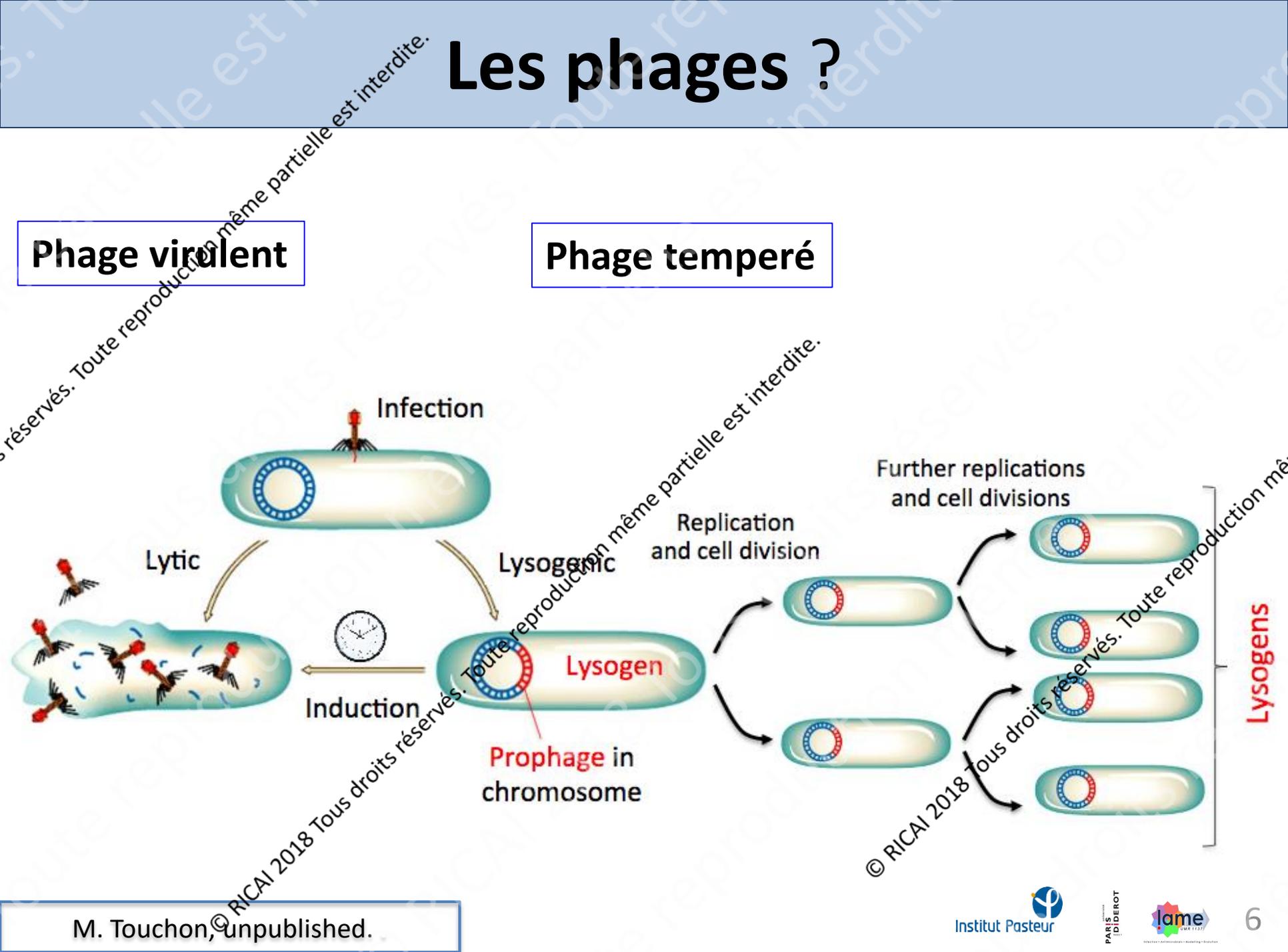
Podoviridae

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Les phages ?

Phage virulent

Phage temperé



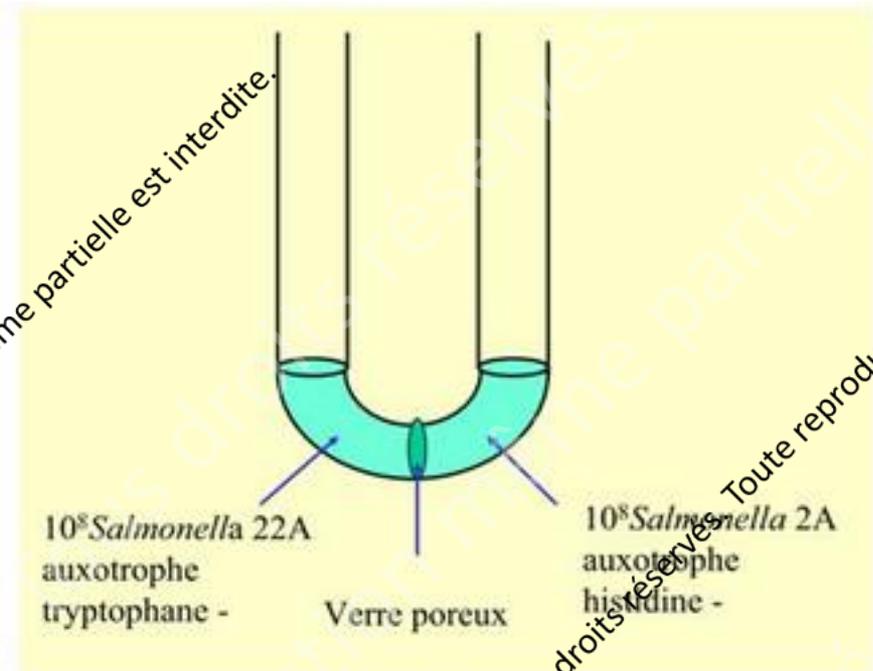


1 μm

Comment les phages peuvent-ils véhiculer du matériel génétique bactérien ?

Expérience de Zinder et Lederberg, 1952

- Filtre entre deux souches → empêche le contact, laisse passer les virus.



Tryp +

hist+

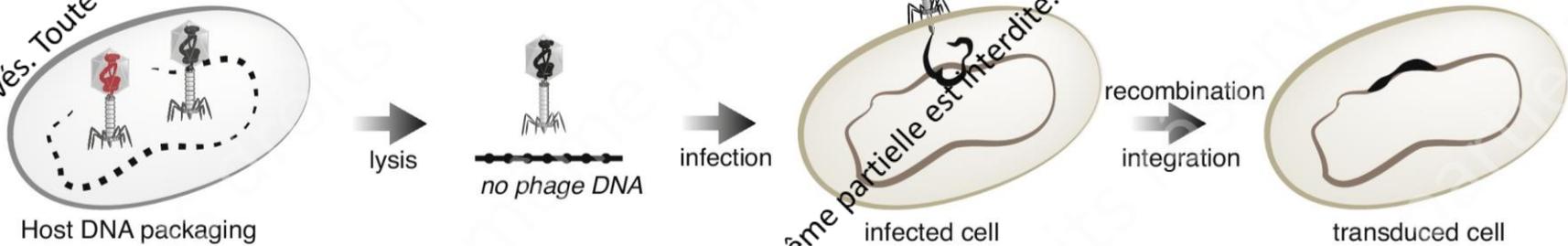
Zinder & Lederberg, *J. Bacteriol.* (1952)

Comment les phages peuvent-ils véhiculer du matériel génétique bactérien ?

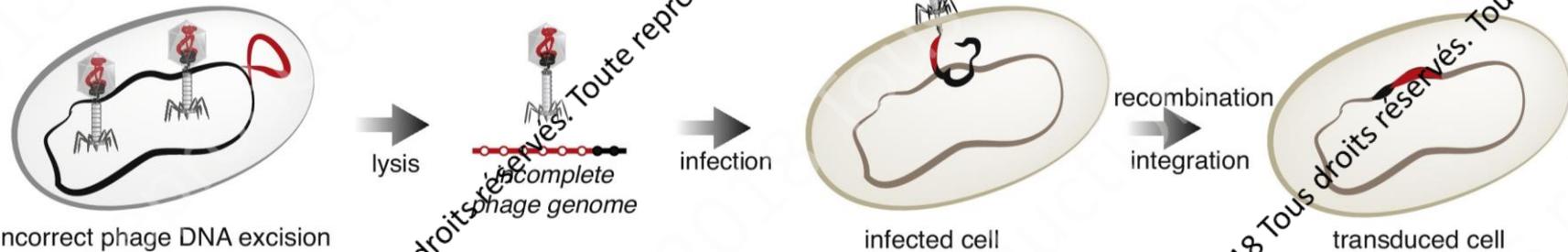
Via la transduction ...

Généralisée (cyle lytique)

(a) Generalized transduction



(b) Specialized transduction



Spécialisée (cyle lysogénique)

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Gènes de résistance aux antibiotiques: émergence et transmission

Bactérie hôte
environnementale
(ex: *Kluyvera*)

Autre bactérie
Ex: Flore digestive
(ex: *E. coli*)

Autre bactérie
Ex: Flore digestive
(ex: *E. coli*,
K. pneumoniae...)



EMERGENCE



TRANSMISSION



Transfert horizontal de gènes:

- Conjugaison: plasmides, ICE
- Transformation
- Transduction: **phage**

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Phages et gènes de résistance aux antibiotiques

Observations: particules phagiques

- **OUI** : il y a des gènes de résistance aux antibiotiques dans les **particules phagiques** isolées:
 - Détection et quantification de gènes de résistance (blaTEM, blaCTXM, mecA) par qPCR ou métagénomique, chez les :
 - phages isolés **d'eaux usées**.
 - phages isolés chez **l'humain**: intestin et poumon

Passage de gènes de résistance aux antibiotiques Phages < -- > Bactéries?

- **OUI**: **in vitro** les phages peuvent transduire des gènes de résistances aux bactéries:
 - Résistance à la méticilline chez *S. epidermidis*
 - Résistance à la tétracycline chez *S. aureus*
- **En faveur du « OUI »** : **in vivo**, gènes de résistance aux antibiotiques recherchés dans fèces (qPCR) et dans les phages isolés. La détection de gènes de résistance dans les phages est plus faible mais suis la même fluctuation que dans les fèces.

Bactérie \leftrightarrow Phages

Taux de transduction?

In vitro



S. aureus USA 300

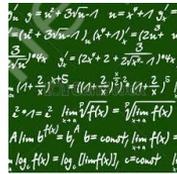
Taux de **transduction généralisée** avec un

ARG:

1/1700 particule phagique

Environnement contrôlé

Modélisation



P1: Phage de *E. coli*

Transduction spécialisée:

Probabilité d'une erreur d'excision : 1/1 000 000

Transduction généralisée:

Proportion de capside avec un ARG: 10^{-5} - 10^{-6}

Environnement complexe

Microbiote
intestinal de
souris



Phage Lamba de *E. coli*

Transduction spécialisée:

Prophage recombinant ARG : fréquence
de $5 \cdot 10^{-8}$ parmi les nouveaux lysogènes

Varga et al., *FEMS* (2012); Volkova et al., *Applied and Env micr* (2014)
De Paepe et al., *PLoS genetic* (2016)

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Microbiote intestinal

- 10^{10-11} **bactéries/g** de selles - > ~ 1 000 espèces différentes
- **Phages ?**
 - 10^{8-12} **particules phagiques/g** de selles, observations microscopiques
 - **Phages tempérés**
 - 46% des génomes bactériens séquencés hébergent au moins 1 prophage (plus de 30kb)
 - Beaucoup de phages tempérés dans les fèces

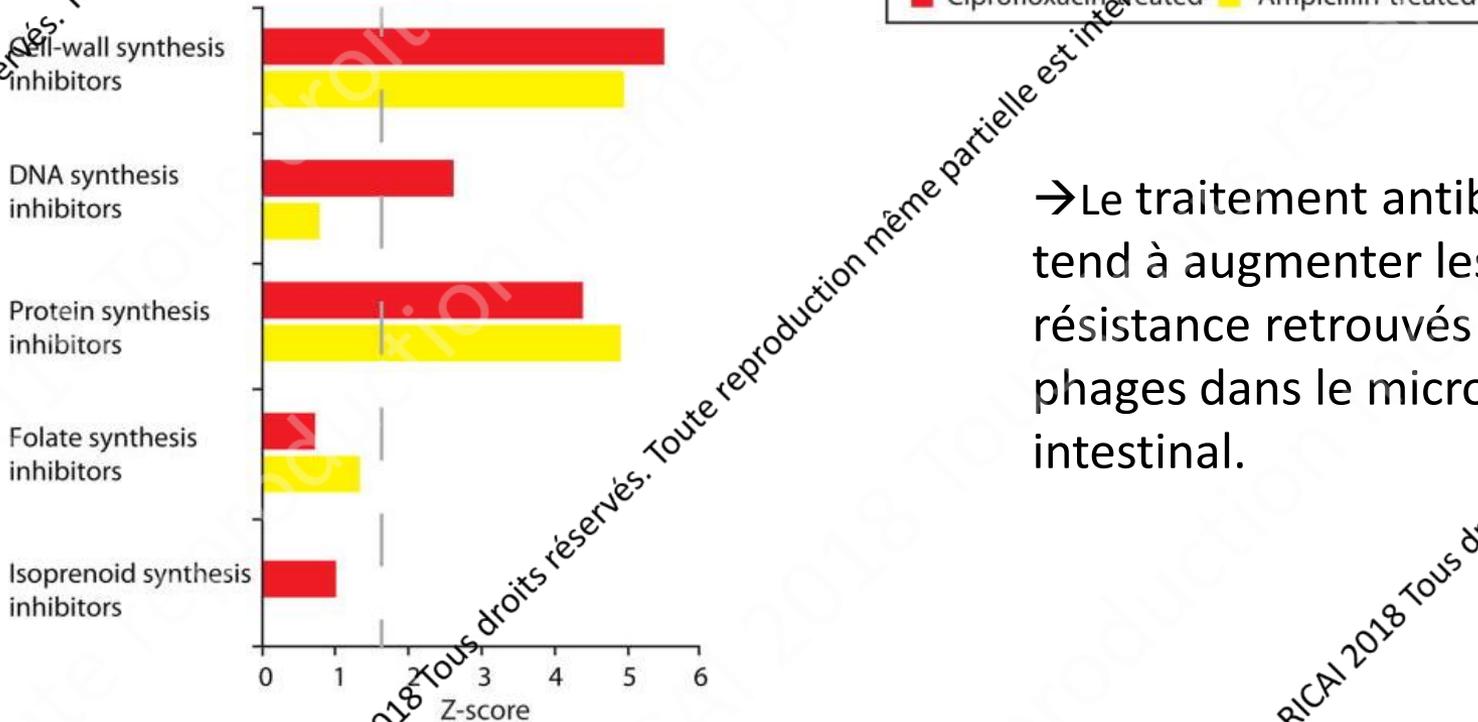
Rôle des phages dans le transfert de gènes de résistance?

Microbiote intestinal: Antibiotique et gènes de résistance (Phage)

- Rôle significatif

- **Souris**

Phage encoded resistance genes by drug class



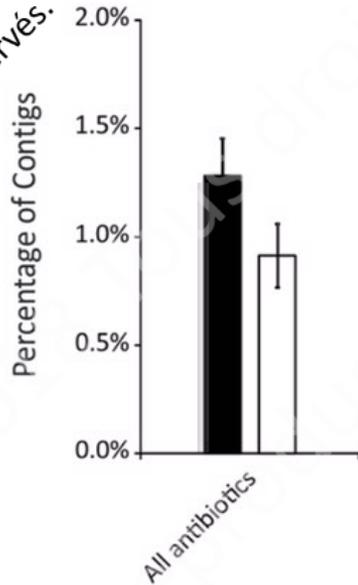
→ Le traitement antibiotique tend à augmenter les gènes de résistance retrouvés chez les phages dans le microbiote intestinal.

Microbiote intestinal: Antibiotique et gènes de résistance (Phage)

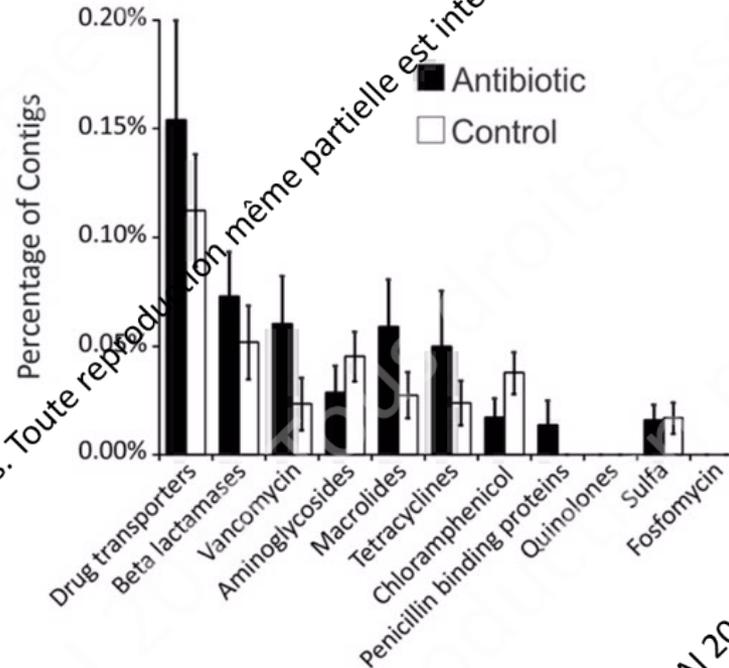
- **Rôle significatif**

- **Homme**, soin intensif

A. Feces

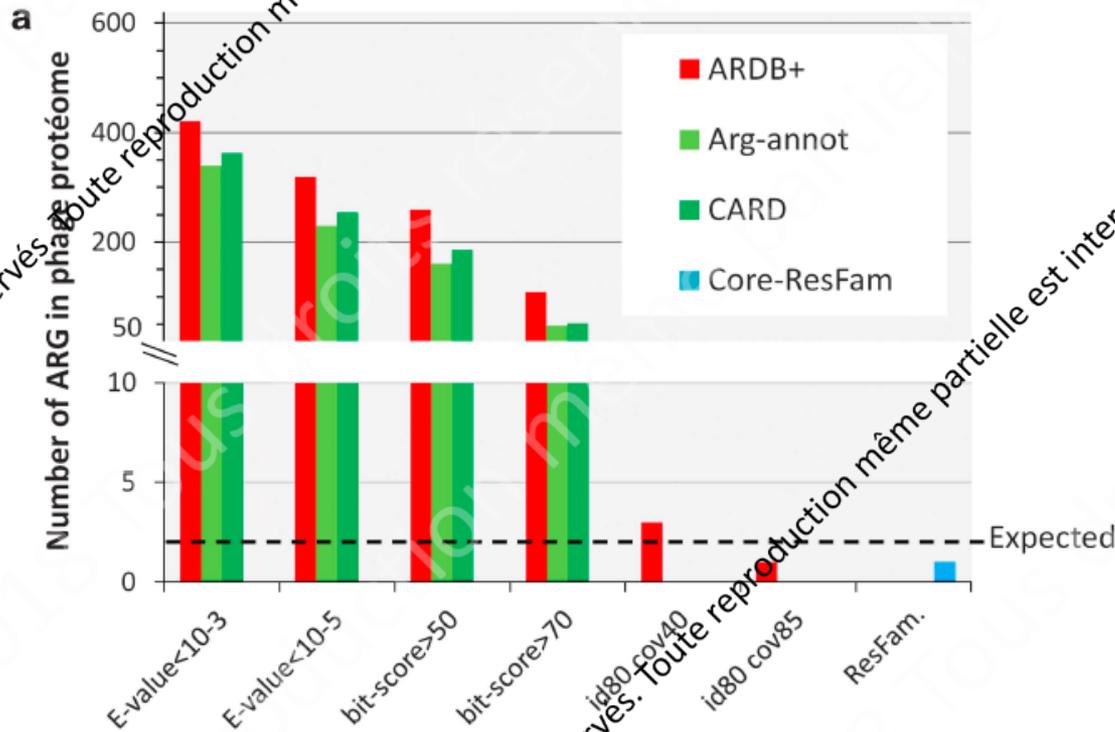


B. Feces



Microbiote intestinal: Antibiotique phage et genes de resistance

- Rôle non significatif



→ méthode bioinformatique plus stricte.

→ Reanalyse des données de phageome de modi *et al.*

→ Absence de gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés

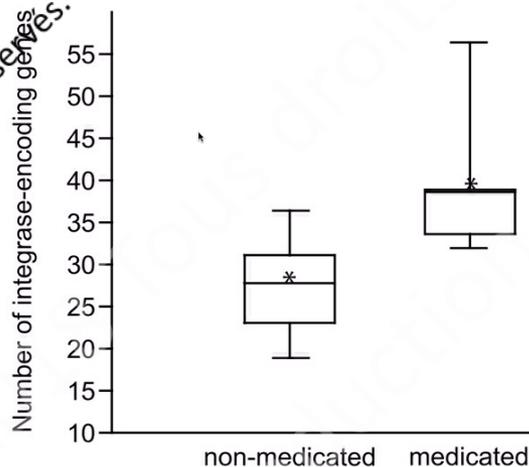
- Problème de la **contamination bactérienne** au cours du processus d'extraction du phage → surestimation du taux de gènes de résistance aux antibiotiques.

Microbiote intestinal: Antibiotique phage et gènes de résistance

- Rôle non significatif

Porc

Cycline et pénicilline.



- L'abondance des phages codant pour une intégrase a augmenté dans le groupe traité → induction phage.

- Pas plus de gènes de résistance aux antibiotiques retrouvés

Les phages véhiculent des gènes de résistance aux antibiotiques: mythe ou réalité?

- **Réalité**

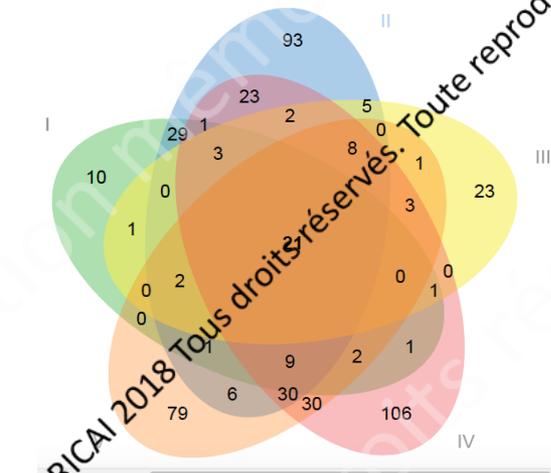
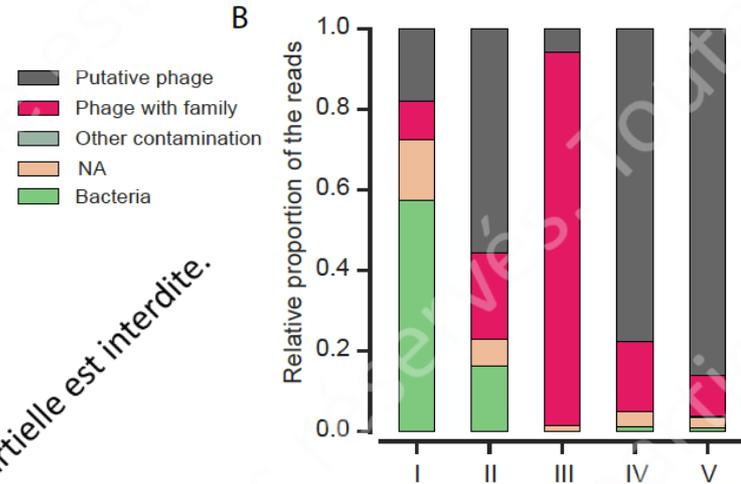
- ✓ Gènes de résistance retrouvés chez les phages
- ✓ Transmission par transduction observée in vitro

- **Mythe ?**

- ✓ Importance du phénomène dans le microbiote intestinal et à plus large échelle?
 - Spectre étroit
 - Taux de transduction faible
 - Limite méthodologique (extraction des phages, bases de données, analyse bioinformatique, contamination bactérienne..)

Analyse des phages dans le microbiote intestinal: méthodologie

- Comparaison de différentes techniques d'extraction de phages et de leur ADN à partir d'un même échantillon de selles
- Nombre de phages en commun retrouvés dans les 5 techniques



Microbiote intestinal: Antibiotique et gènes de résistance (phage)

22 volontaires sains

Etude prospective, ouverte, randomisée



Predires

Pr F. Mentré

Collection de selles:

Traitement ATB: C3G

J-14

J-7

J-1

J1

J2

J3

J4

J7

J10

J15

J30

J90

J180

Etudes des selles:

- Microbiome bactérien et résistome
- **Phageome et résistome**
- Métapopulation de *E. coli*

Question posée:

Chez le volontaire sain sous pression antibiotique, les phages participent-ils à la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques?

Remerciements

- Laboratoire d'**Eduardo Rocha**, Institut Pasteur, équipe GEM (Genomique Evolutive des Microbes)
- Laboratoire d'**Erick Denamur**, IAME, Faculté de médecine Xavier Bichat.
- Laboratoire de bactériologie de l'hôpital Bichat

