

# Utilisation des bactériophages en élevage ou en industrie agroalimentaire pour lutter contre les bactéries pathogènes

Période : septembre 2015 à décembre 2015

**Michel GAUTIER** | [michel.gautier@agrocampus-ouest.fr](mailto:michel.gautier@agrocampus-ouest.fr)

Agrocampus Ouest/Inra - laboratoire de microbiologie/UMR STLO 1253 – Rennes - France

Mots clés : aliment, antibiotique, aquaculture, assainissement, bactérie pathogène, bactériophage, phagothérapie

Face à l'émergence de souches<sup>\*</sup> bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques (1), les approches basées sur des alternatives à l'utilisation de ces molécules prennent de plus en plus d'importance. Les bactériophages<sup>\*</sup> étant capables de lyser rapidement les cellules bactériennes font partie de ces alternatives. S'ils ont été découverts au début du siècle précédent, leur utilisation en tant qu'agent antibactérien a été considérablement entravée par l'avènement des antibiotiques. Leur principal inconvénient est de présenter un spectre d'action beaucoup moins étendu que ces derniers (2). En 2014, le parlement européen a proposé une motion demandant aux membres de la communauté européenne de prioriser le développement de la phagothérapie<sup>\*</sup> comme complément à l'antibiothérapie (3). Le premier exemple discuté ici traite de l'utilisation d'un phage<sup>\*</sup> en aquaculture, afin d'empêcher l'infection des poissons contre une bactérie pathogène très commune. Le second, vise à limiter la multiplication d'une bactérie pathogène dans un aliment. Ces deux études sont caractéristiques de la démarche scientifique mise en place pour l'utilisation des phages en tant qu'agent bactéricide. Elles permettent d'évaluer les potentialités et les faiblesses de cette approche.

## Utilisation du phage FCVL-2 comme solution alternative, en aquaculture, contre la columnariose

Elina Laanto, Jaana K.H. Bamford, Janne J. Ravantii and Lotta-Riina Sundberg. The use of phage FCVL-2 as an alternative against columnaris disease in aquaculture. *Frontiers in microbiology* 2015, volume 8 Article 829

### Résumé

*Flavobacterium columnare* est une bactérie responsable de la columnariose<sup>\*</sup>, maladie qui touche plusieurs espèces de poissons, notamment utilisées en aquaculture (4). Afin de diminuer le nombre et la gravité des infections, les auteurs ont utilisé un phage actif contre cette bactérie (5). Ce bactériophage fait partie des *Myoviridae*<sup>\*</sup>. La taille de son génome est de 47,1 kb<sup>\*</sup>. Parmi les 74 ORF\* actuellement prédits, il reste 67,6% d'entre eux de fonction inconnue. Aucun gène n'indique de potentiel de lysogénie<sup>\*</sup>. Par contre deux protéines pourraient être des facteurs de virulence<sup>\*</sup> impliqués dans les interactions hôte/pathogène chez *E. coli* (6). La truite arc-en-ciel et le poisson zèbre ont été utilisés pour réaliser des expérimentations. L'infection de 260 truites arc-en-ciel s'est faite en plongeant les poissons pendant 2h, dans un aquarium contaminé par *Flavobacterium columnare*, à raison de 3.10<sup>6</sup> CFU<sup>10</sup>/ml. Chaque poisson était ensuite élevé séparément dans un petit aquarium pendant sept jours. Deux concentrations de bactériophages ont été utilisées : un phage par bactérie ajoutée et 10 phages par bactérie ajoutée. Au bout de cette période, le taux de survie des truites témoins infectées était de 8,3%. L'addition de phage a entraîné une longévité et une survie semblables au contrôle témoin non infecté. Le ratio de un phage pour une

bactérie était le plus efficace (50% de survie). Le mode d'infection du poisson zèbre a été différent, puisque celui-ci a été exposé en continu (5.10<sup>4</sup> CFU/ml) pendant tout le temps de l'expérimentation. L'addition de phage, à un ratio de 1 pour 1, a permis la survie de 60% des poissons zèbres (contre 100% de mortalité dans le lot témoin).

### Commentaire

Les résultats de ces travaux sont plutôt probants, puisque la longévité et la survie des poissons sont considérablement améliorées. Le système est particulièrement efficace car l'addition du phage se fait en milieu liquide, ce qui favorise la rencontre entre le phage et la bactérie cible. En effet, cette dernière est présente dans l'eau ou à la surface des poissons, où débute en général l'infection des tissus. Cependant, plusieurs difficultés techniques restent à résoudre. Notamment, un des problèmes importants que rencontre la phagothérapie est l'apparition rapide d'une population bactérienne résistante aux bactériophages. Dans ce travail, l'expérimentation n'a pas été menée assez longtemps pour évaluer la probabilité d'apparition de ces résistances. De plus, l'étude ne porte que sur un seul phage et une seule souche de *Flavobacterium columnare*. Or, l'infection phagique est souvent souche spécifique (2), il est donc fort probable que des souches environnementales de *Flavobacterium columnare* ne soient pas sensibles au phage utilisé. D'un point de vue sanitaire, des travaux sur les protéines concernées, c'est-à-dire celles impliquées dans la virulence des phages, devront être menés afin d'évaluer le risque de dissémination de ces gènes à d'autres bactéries. Enfin, la phagothérapie nécessite l'inoculation de très grandes quantités de phages dans les bassins d'élevage : la préparation de stocks de phages à l'échelle industrielle

nécessite de pouvoir les propager en milieux liquides. Or, le phage utilisé ici ne peut se propager que sur un milieu gélosé sur lequel la bactérie a été inoculée ; un tel système n'est pas envisageable pour préparer des solutions concentrées en phages. Les auteurs devront trouver de nouveaux phages pouvant être propagés en milieu liquide.

### Un nouveau bactériophage ciblant *Cronobacter sakazakii* comme potentiel agent biologique dans les aliments

Ju-Hoon Lee, Jaewoo bai, Hakdong Shin, Yeran Kim, Bookyung Park, Sungii Heu, Sanggryeol Ryu. A novel bacteriophage targeting *Cronobacter sakazakii* is a potential biocontrol agent in food..Applied Environmental microbiology.

#### Résumé

L'objectif de ce travail était d'isoler un phage infectant *Cronobacter sakazakii*, bactérie impliquée dans des toxico-infections alimentaires graves, liées à l'ingestion de 'préparations pour nourrisson' contaminées (7). Le phage isolé et étudié appartient à la famille des *Myoviridae*. Son génome comprend 231 ORF putatifs. Seuls 20% de ces ORF correspondent à des fonctions connues chez les bactériophages. Aucune homologie avec des gènes codant des toxines connues ou impliqués dans la virulence bactérienne ou dans la lysogénie n'a été trouvée. Sur 17 souches de l'espèce *sakazakii* testées, dix sont clairement infectées par le phage et sept montrent une sensibilité à celui-ci. De plus, les auteurs ont identifié par mutagenèse dirigée, un gène codant une protéine flagellaire\* qui sert de récepteur au phage. Les auteurs ont ajouté ce phage à une préparation pour nourrisson artificiellement contaminée par *Cronobacter sakazakii* à raison  $10^2$ CFU/ml et ont étudié la viabilité de cette bactérie. Le bactériophage a été ajouté de manière à obtenir  $10^4$  ou  $10^5$  phages pour une bactérie. Les bactéries ont été ensuite dénombrées pendant l'incubation du lait à 37°C, sous agitation pendant 10h. A la plus forte dose de phage, il n'y avait plus de croissance de la bactérie même après dix heures démontrant ainsi la lyse de toutes les bactéries.

#### Commentaire

Le principe de ce travail est d'utiliser les bactériophages pour tuer les bactéries pathogènes ou, tout au moins, ralentir leur multiplication dans les aliments (8,9). Comme précédemment, l'efficacité du procédé est facilitée puisque l'aliment choisi est utilisé à l'état liquide. De plus, le lait était agité durant les 10h de l'expérimentation, condition de laboratoire qui favorise la rencontre phage/bactérie, mais qu'on ne retrouvera pas lors de son utilisation par le consommateur, puisque le lait n'est reconstitué que juste avant d'être donné au nourrisson. Un résultat intéressant est l'identification du récepteur phagique de la souche utilisée. Ce récepteur est flagellaire, or il a été montré que les souches résistantes au phage, suite à une mutation du gène impliqué, devenaient avirulentes\*, la mobilité du flagelle étant impliquée dans la virulence. Les auteurs n'ont cependant pas recherché les capacités de virulence de leur mutant résistant. Pour que le phage soit réellement efficace

il doit être efficace contre toutes les souches de *Cronobacter sakazakii*. Or seulement 17 ont été testées et seulement dix sont visiblement infectées. Les sept autres présentent une inhibition par le phage qu'il conviendrait d'investiguer afin d'établir clairement le spectre d'hôte\* du phage. Enfin, même si aucun gène codant des toxines ou des facteurs de virulence n'a été identifié sur l'ADN phagique, il n'en demeure pas moins que plus de 80% des ORF sont de fonctions inconnues et qu'à ce titre, l'utilisation à grande échelle de ce phage dans les aliments pose question.

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le choix de ces deux publications permet d'illustrer les potentialités de l'utilisation des bactériophages, pour limiter le développement des bactéries pathogènes en élevage et en agroalimentaire. Les deux exemples discutés ici se placent dans les utilisations les plus favorables des bactériophages: en surface de l'organisme à décontaminer ou dans un liquide. En effet, pour qu'il soit efficace, le procédé doit permettre une rencontre aisée du phage et de sa bactérie cible. C'est pourquoi la littérature fait souvent état de ce procédé pour le traitement des surfaces, notamment pour éradiquer des biofilms\* colonisant une plaie, les cathéters en milieu hospitalier ou les surfaces en agroalimentaire (10). D'ailleurs l'US FDA reconnaît l'utilisation des phages dans les aliments comme un procédé de biocontrôle. En thérapie humaine, il est aussi possible d'administrer les phages par voie sanguine mais l'organisme ainsi soigné peut produire des anticorps contre les particules phagiques. La réussite du procédé dépend aussi du spectre d'hôte du phage : ce dernier doit être actif sur le plus grand nombre possible de souches de l'espèce ciblée. Certains procédés utilisent un phage ayant un spectre d'hôte très étendu, et donc actif sur toutes les souches de l'espèce ciblée. Il est aussi possible d'utiliser des cocktails de phages différents permettant d'infecter la majorité des souches de l'espèce. Comme de très grandes quantités de particules phagiques sont utilisées sur du long terme, il est indispensable que celles-ci interagissent le moins possible avec le génome de la bactérie cible. C'est pourquoi, beaucoup de travaux visent à n'utiliser que des phages virulents\*, écartant ainsi les phages tempérés\*. En effet, l'insertion du génome des phages tempérés dans celui des bactéries conduit à l'apparition de variants\* résistants au phage. Cette insertion peut également entraîner des remaniements génétiques de la bactérie et aussi conduire à l'apparition de nouveaux phages lors de leur excision\* du chromosome bactérien, lorsqu'il y a multilysogénie\*. Il est aussi essentiel de sélectionner des phages qui ne peuvent véhiculer que leur propre ADN. En effet certains phages sont capables de transporter à la place de leur génome, de l'ADN bactérien, puis d'infecter par la suite d'autres bactéries avec celui-ci. Ce mécanisme appelé transduction généralisée\* peut conduire à l'acquisition de nouveaux gènes, par la bactérie receveuse. De plus, une analyse fine du génome phagique est nécessaire: celui-ci ne doit pas porter de gènes codant des facteurs de virulence ou des toxines connus et répertoriés dans les bases de données. Enfin, il convient de s'assurer que l'utilisation à grande échelle d'un phage actif sur la majorité des souches d'une espèce donnée ne provoque pas, par l'émergence d'autres espèces, de bouleversements écologiques délétères au sein de l'écosystème microbien concerné.

**GENERAL CONCLUSION**

*The choice of these two publications was based on the need to illustrate the potential of the use of bacteriophages to limit the development of pathogenic bacteria in breeding and agribusiness sectors. Both examples discussed here consider the most favorable use of bacteriophages: surface or liquid decontamination. Indeed, to be effective, the process must promote contact between the phage and the target bacterium. That is why literature often describes methods for the treatment of surfaces, namely for eradicating biofilms colonizing wounds or catheters in the health sector and for decontaminating industrial surfaces in the food sector (10). Moreover US FDA recognizes the use of phages in food as a process of biocontrol. In human therapy, it is also possible to administer the phage through blood but the body may produce antibodies against the phage particles. The success of the process also depends on the host range of the phage. This later must be active on the largest number of strains belonging to the target species. Some methods utilize phage with a very wide host range and which are therefore active on all strains of the target species. It is also possible to use different phage cocktails to infect the majority of the strains of the same species. As large quantities of phage particles are used to the long term, it is essential that they minimally interact with the genome of the target bacteria. Therefore, a lot of works is designed to use only virulent phages, thus removing temperate phages. Indeed, the insertion of the genome of the phage inside the bacterial genome leads to the appearance of phage-resistant variants<sup>18</sup>. It can also lead to the appearance of genetic mutants of the target bacteria. Moreover, in case of multilyso-geny, new phages may appear by recombination during their excision from the chromosome. It also seems essential to select phages which DNA would be specifically packaged in the head of the bacteriophage. Indeed, these phages cannot perform generalized transduction, mechanism which can lead to the acquisition of new genes by the recipient bacteria. Moreover, a detailed analysis of the phage genome is necessary: the genome must not carry genes encoding virulence factors or known toxins listed in the database. Finally, it should ensure that the large-scale use of an active phage on the majority of the strains of a given species does not cause, by the emergence of other species, deleterious changes in the microbiobial ecosystem concerned.*

**Lexique**

**Avirulent** : Qui a perdu sa virulence

**Bactériophage ou phage** : Virus infectant spécifiquement les bactéries

**Biofilm** : Développement d'une communauté microbienne composée d'individus adhérents entre eux et sur les surfaces

**CFU = Colonie Formant Unité** : Unité de mesure traduisant le nombre de bactéries viables ; chacune forme une colonie en se multipliant.

**Columnariose** : Maladie entraînant la mort des poissons et due à une bactérie, *Flavobacterium columnare*, qui provoque des ulcérations très importantes notamment au niveau des nageoires et des branchies

**Excision** : Phénomène qui permet à un prophage de s'extraire du chromosome bactérien et commencer un cycle lytique

**Facteur de virulence** : Composant d'un microorganisme qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie

**Flagellaire** : Relatif au flagelle, organe filamenteux permettant la motilité à certaines bactéries

**Kb** : Kilobase : 1Kb=1000 bases nucléotidiques

**Lysogénie** : Etat caractérisant une bactérie qui présente un ADN phagique intégré sur son génome (prophage)

**Multilysogénie** : Etat caractérisant une bactérie qui présente plusieurs ADN phagiques intégrés sur son génome (prophages)

**Myoviridae** : Grande famille de bactériophages à ADN double brin, possédant une queue contractile, une tête allongée ou isométrique

**ORF** : Open reading frame ou cadre ouvert de lecture : séquence d'ADN susceptible de coder une protéine

**Phagothérapie** : Utilisation des bactériophages comme moyen de lutte contre les bactéries pathogènes

**Préparation pour nourrisson** : Aliment lacté diététiques (ALD) destiné aux nourrissons, et pour lequel le terme 'maternisé' est interdit depuis les années 1990 (art. 18 Arrêté du 11 janvier 1994)

**Souche** : Une espèce bactérienne est constituée de plusieurs souches qui regroupent les individus qui se ressemblent.

**Spectre d'hôte** (bactériophage) : Etendue des souches ou des espèces chez lesquelles un bactériophage peut se multiplier

**Tempéré** : Se dit d'un bactériophage dont le génome est capable de s'intégrer dans celui de la souche bactérienne qu'il infecte. Tant que son génome est intégré, ce phage ne provoque pas de lyse de la cellule

**Transduction généralisée** : Capacité de certains phages à empaqueter, à la place de leur ADN, des fragments d'ADN bactérien puis, d'infecter par la suite les bactéries avec ces fragments.

**Variant** : mutant

**Virulent** : Se dit d'un bactériophage strictement lytique : l'infection de la bactérie conduit à sa lyse, libérant de nouveaux phages

## Publications de référence

1 **Hollis and Ahmed Z.** Preserving antibiotics, rationally. *New Engl.J. Med.* 2013;(369) 2474-2476.

2 **Drulis-Kawa Z, et al.** Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded proteins applications. *Curr. Protein Peptide Sci.* 2012;(13):699-722.

3 **Parlementary Assembly.** Phage therapy, a public Health Issue-Motion for a resolution, pp. 1-2, Council of Europe 2014.

4 **Declercq A, Haesebrouck F, Van der Broeck W, Bossier P and Decostere A.** Columnaris disease in fish : a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Vet. Res.* 2013 44:27.

5 **Laanto E, Sundberg LR, and Bamford JKH.** Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare* ; *Appl. Environ. Microbio.* 2011;(77):7868-7872.

6 **Sandt CH, and Hill CW.** Four different genes responsible in nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2000;(68):2205-2214.

7 **Drudy D, Mullane NR, Quinn T, wall PG, and Fanning S.** *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula ; *Clin Infect Dis* 2006;(42):996-1002.

8 **Guenther S, Huwiler D, Richard S, and Loessner MJ.** Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol* 2009;(75):93-100.

9 **Zhang H, Wang R, and Hongduo B.** Phage inactivation of foodborne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken. *Poult Sci* 2013;( 92):211-17.

10 **Chan BK and Abedon ST.** Bacteriophages and their enzyme in biofilm control. *Curr Pharm Design* 2015;(2): 85-99.

## Revue de la littérature

**Oliveira H, Sillankorva S, Merabishvili M, Kluskens LD, and Joana Azeredo.** Unexploited opportunities for phage therapy *J. frontiers in pharmacology* 2015;6:(180).

**Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, and Azeredo J.** revisiting phage therapy : new applications for old resources *Trends in Microbiology* 2015;23 (4):185-90.

**Wessam AS, and Azzazy HME.** Phage approved in food, why not as a therapeutic *Expert Rev. Anti infect. Ther* 2015;13 (1) :91-10.

**Hyman P, and Abedon ST.** Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 2010;(8): 217-248.

Revue décrivant tous les mécanismes que développent les bactéries afin de surmonter les attaques phagiques. La connaissance de ces mécanismes est essentielle en

phagothérapie afin de pouvoir sélectionner des cocktails phagiques efficaces.

### Autres publications identifiées

**Abedon ST.** Ecology of anti-biofilm Agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals* 2015;**8**:525-58.

*Revue très complète mettant en exergue les avantages de l'utilisation des bactériophages par rapport à celle des antibiotiques pour lutter contre les biofilms. Les modes de destruction de biofilms par ces deux agents bactéricides sont particulièrement détaillés.*

**Abedon ST.** Ecology of anti-biofilm Agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. *Pharmaceuticals* 2015;**8**:559-89.

*Revue très complète explorant les modalités d'utilisation des bactériophages dans la lutte contre les biofilms notamment ceux rencontrés en milieu hospitalier. L'écologie des bactériophages au sein des biofilms est particulièrement étudiée.*

### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt