

LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES AUX ANTIBIOTIQUES : COMBINAISONS DE MÉCANISMES BICHIMIQUES ET GÉNÉTIQUES

BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE : COMBINATIONS OF BIOCHEMICAL AND GENETIC MECHANISMS

Par Patrice COURVALIN⁽¹⁾
(communication présentée le 4 octobre 2007)

RÉSUMÉ

L'utilisation, souvent abusive, des antibiotiques favorise l'évolution des bactéries vers la résistance entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques. La résistance bactérienne peut être intrinsèque ou acquise. La résistance intrinsèque est spécifique d'espèce ou de genre et définit le spectre d'activité de l'antibiotique. La résistance acquise est présente seulement dans certaines souches de l'espèce ou du genre. Elle est le résultat de mutations dans un gène localisé dans le chromosome de la bactérie ou dans un plasmide ou celui de l'acquisition d'informations génétiques, principalement par conjugaison ou transformation.

Mots-clés : antibiotique, bactérie, conjugaison, intégron, mutation, plasmide, résistance, transposon.

SUMMARY

The use of antibiotics, often excessive, promotes the development of bacterial resistance, frequently resulting in therapeutic failure. Bacterial resistance can be intrinsic or acquired. Intrinsic resistance is species or genus specific and define the spectrum of activity of the antibiotic. Acquired resistance is only present in certain strains of the species or genus. It is due either to a mutation in a gene located in the host chromosome or in a plasmid, or to the acquisition of genetic information by a bacterium, mainly by conjugation or transformation.

Key words : antibiotic, bacteria, conjugation, integron, mutation, plasmid, resistance, transposon.

(1) Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. E-mail : pcourval@pasteur.fr

En réponse à la pression de sélection antibiotique, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes conférant la résistance à la bactérie hôte, ainsi que sa capacité de transmission à d'autres bactéries. Ces microorganismes combinent notamment des mécanismes à large spectre de substrats, qui leur permettent de résister simultanément à diverses classes d'antibiotiques et de devenir ainsi multirésistants.

Les nombreux antibiotiques utilisés en médecine humaine, vétérinaire ou vis-à-vis des bactéries phytopathogènes peuvent être regroupés en classes. Ceux appartenant à la même classe ont des structures chimiques apparentées. Ils ont donc, en général, la même cible dans la cellule et par là le même mode d'action. Ils sont donc soumis aux mêmes mécanismes de résistance. L'étude de la résistance et le raisonnement en ce qui a trait aux mécanismes biochimiques doivent donc se faire en termes de classes et non de molécules isolées.

TYPES DE RÉSISTANCE

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance intrinsèque et la résistance acquise. La résistance intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité) est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramines, etc.).

A l'inverse, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre ; dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches comme, par exemple, la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse plus de 90 % des souches.

Sur le plan biochimique, les bactéries ont développé quatre grands mécanismes d'acquisition de la résistance (**figure 1**) : i) la modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière ; ii) la production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique ; iii) l'imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines (pores au niveau de la membrane externe) chez les bacilles à Gram négatif et iv) l'efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes. Le motif commun à ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible.

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes. Soit des mutations dans le génome, on parlera alors de transmission verticale à la descendance, soit l'acquisition d'information génétique étrangère, en provenance d'autres bactéries, par transfert horizontal.

BIOCHIMIE DE LA RÉSISTANCE

Résistance croisée

La résistance croisée correspond à la résistance à tous les membres d'une classe d'antibiotiques due à un seul mécanisme de résistance. La résistance est de niveau variable selon les antibiotiques, en général d'autant plus faible que la molécule est plus active. Un mécanisme de résistance n'a donc pas de valeur absolue ; il amplifie le niveau d'antibiotique que peut tolérer la bactérie hôte. Ce niveau sera d'autant plus élevé que l'espèce bactérienne est moins sensible au départ. C'est ainsi que le même déterminant de la résistance confèrera à *Pseudomonas aeruginosa*, qui est naturellement peu sensible, un niveau de résistance très supérieur à celui chez *Neisseria meningitidis* qui est extrêmement sensible.

Parmi les nombreux cas de résistance croisée, on peut citer les mutations dans les topoisomérases de type II, gyrase et topoisomérase IV, conférant la résistance aux fluoroquinolones (**tableau 1**) ou la résistance aux 4-6-desoxystreptamines par méthylation de l'ARN 16S (Galimand *et al.* 2005). La conséquence majeure de la résistance croisée est la sélection croisée : n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner des bactéries résistantes à tous les autres membres.

Co-résistance

Dans la co-résistance, plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun confère (par résistance croisée) la résistance à une classe d'antibiotiques, ce qui entraîne *in fine* un large phénotype résistant de la bactérie hôte. Là encore, la conséquence de cette organisation génétique est la co-sélection. Dans ce cas, une classe d'antibiotiques à laquelle la bactérie est résistante pourra sélectionner la résistance à des classes d'antibiotiques non reliées. Ceci est par exemple le cas chez les pneumocoques (**tableau 2**).

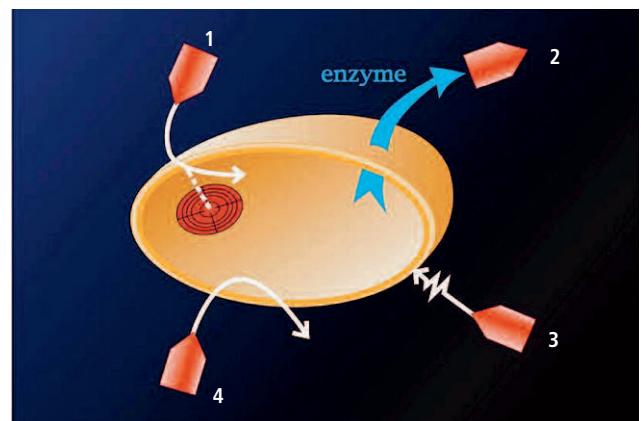


Figure 1 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. 1- modification de la cible, qui entraîne une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière ; 2- production d'une enzyme qui va détoxifier l'antibiotique ; 3- imperméabilité, notamment par diminution du diamètre des porines chez les bacilles à Gram négatif ; 4- efflux des antibiotiques à l'extérieur de la cellule par des pompes énergie dépendantes.

Mutation ^(a)			Concentration minimale inhibitrice (CMI, mg/L) de ^(b)						
GyrA	ParC	ParE	CIP	Ofl	Lev	Spa	Gre	Mox	Gat
-	-	-	1	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25
Ser83-Phe	-	-	2	4	4	4	2	2	1
Ser83-Tyr	-	-	2	4	4	4	2	2	1
-	Asp83-His	-	8	4	4	0,5	0,5	0,5	0,5
-	Ser79-Phe	-	8	8	4	0,5	1	1	0,5
-	-	Asp435-Asn	8	8	4	0,25	0,5	0,5	0,5
Ser83-Phe	Asp83-His	-	32	32	16	16	16	4	4
Ser83-Tyr	Asp83-His	-	32	32	16	16	16	4	4
Ser83-Tyr	Ser79-Phe	-	16	32	16	8	8	4	4
Ser83-Phe	Ser79-Phe	-	32	32	16	16	16	8	4
Ser83-Phe	-	Asp435-Asn	16	64	32	8	8	8	8
Ser83-Phe	Asp83-His	Asp435-Asn	64	64	32	16	16	8	8

Tableau 1 : Sensibilité de transformants de *S. pneumoniae* aux fluoroquinolones.

(a) GyrA, gyrase sous-unité A ; ParC, ParE, topoisomérase IV sous-unité C et E, respectivement.

(b) CIP, ciprofloxacine ; Gat, gatifloxacine ; Gre, grépafloracine ; Lev, levofloxacine ; Ofl, ofloxacine ; Spa, sparfloxacine. Par exemple, l'association des trois mutations (dernière ligne) confère la plus forte résistance aux fluoroquinolones appréciée par la concentration minimale d'antibiotique (exprimée en mg/L) qui inhibe la croissance visible de la bactérie.

En France, parmi les isolats cliniques de pneumocoques, 46 % des souches sont sensibles à la pénicilline G, alors que 54 % sont résistantes à cet antibiotique (Goldstein 1999). Si l'on compare la résistance de ces deux groupes de bactéries aux autres classes d'antibiotiques, au vu des résultats présentés dans les deux premières lignes du **tableau 2**, on note que les souches résistantes sont beaucoup plus fréquemment résistantes à ces autres classes. Si maintenant on ne s'intéresse qu'aux souches résistantes à la pénicilline G (c'est-à-dire qu'on les considère 100 %), on s'aperçoit que la résistance aux autres classes est alors extrêmement élevée (voir les résultats dans les colonnes correspondant aux quatre dernières lignes du **tableau 2**) : par exemple, l'administration de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®, l'antibiotique le plus utilisé au monde, notamment chez les malades atteints de SIDA), a 88 % de chance de co-sélectionner une souche de pneumocoque résistante à la pénicilline G, bien que ces molécules aient des modes d'action totalement distincts et soient l'objet de mécanismes de résistance différents.

Un autre exemple de système de co-résistance est fourni par les intégrons. Les bacilles à Gram négatif ont développé un système très élégant et efficace de capture et d'expression de gènes de résistance (très exactement ce que tentent d'obtenir les expériences de clonage de gènes au laboratoire) : les intégrons. De petits fragments d'ADN bicaténaires circulaires qui ne contiennent qu'un gène de résistance (et ne peuvent donc répliquer de manière autonome), flottent dans le cytoplasme des bactéries (cassette R, **figure 2**). Ils peuvent s'intégrer de façon réversible et spécifique de site, grâce à l'activité d'une intégrase (Int), en aval d'un promoteur fort P_C, par recombinaison entre les séquences attC et attI, respectivement les sites d'attachement des cassettes et de l'intégron. Ceci permet l'expression du

gène de résistance (**figure 2**). En présence d'antibiotique, les bactéries ayant intégré un gène conférant la résistance à cette molécule seront sélectionnées. Par contre, en l'absence d'antibiotique, les bactéries qui n'avaient pas intégré le gène et donc ne l'expriment pas, ne dépensent pas (ou très peu) d'énergie pour une résistance inutile. Leur « fitness » ou degré de compétition dans un environnement sans antibiotique sera donc analogue à celui des bactéries sensibles. L'acquisition de la résistance par une bactérie correspond au gain d'une fonction. Ceci implique un coût biologique pour la bactérie, qui se traduit par une baisse de fitness, c'est-à-dire de compétitivité par rapport à la souche parentale sensible en l'absence d'antibiotique dans le milieu environnant. Pour être écologiquement compétitive et donc respecter au mieux le principe de parcimonie (c'est-à-dire dimi-

S. pneumoniae (%)	Résistant à (%)				
	PenG ^(a)	Em	Cm	Tc	Tp-Su
PenS (46 %)	0	20	14	15	10
PenI + R (54 %)	100	80	38	51	66
EmR	82	100			
CmR	77		100		
TcR	80			100	
Tp-SuR	88				100

Tableau 2 : Résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae* en France (Goldstein 1999).

(a) Cm, chloramphénicol ; Em, érythromycine ; PenG, pénicilline G ; Su, sulfamides ; Tc, tétracyclines ; Tp-Su, triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®).

R et S, respectivement souches résistantes et sensibles : par exemple, PenS : souche de *Pneumonia* sensible à la pénicilline G, PenI + R : souche intermédiaire résistante à la pénicilline G à 54 %, EmR : souche résistante à l'érythromicine à 100 % etc. Explications dans le texte.

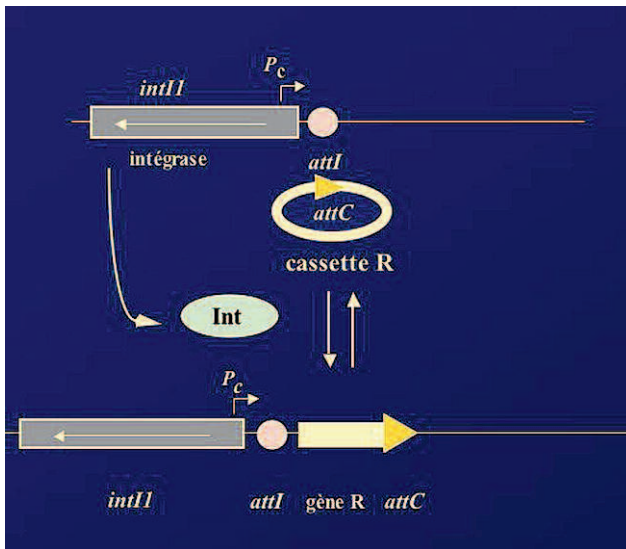


Figure 2 : Structure d'un intégron et intégration d'une cassette attC, site d'attachement des cassettes ; attI, site d'attachement de l'intégron ; intI1, gène de l'intégrase ; Int, intégrase ; Pc, promoteur des cassettes ; R, résistance. Explications dans le texte.

nuer l'énergie qu'elles dépensent pour devenir résistantes), les bactéries ont du développer des approches diverses. Une des plus efficaces et des plus répandues est l'induction de la résistance, qui fait que la résistance n'est exprimée que lorsque la bactérie est en contact avec l'antibiotique, lequel se comporte alors comme un inducteur de l'expression de la résistance à lui-même, c'est-à-dire lorsque la résistance est requise.

Résistance croisée étendue

Ce type de résistance est du à la présence d'un seul mécanisme de résistance (il s'agit donc bien d'une résistance croisée), mais qui a la capacité de conférer la résistance à plusieurs classes d'antibiotiques, d'où l'adjectif « étendue ». Là encore, la conséquence en est la sélection croisée étendue, c'est-à-dire que, comme dans la co-sélection mais pour une différente organisation biochimique et génétique, une classe d'antibiotiques peut sélectionner des bactéries résistantes à d'autres classes de molécules.

Ceci est par exemple le cas de la résistance par surexpression de pompes d'efflux qui peuvent avoir des profils de substrats très étendus. Les pompes, qui sont des protéines membranaires, sont regroupées en super-familles qui tirent leur énergie soit de la force proton-motrice, soit de l'hydrolyse de l'ATP (figure 3). Chez les bactéries à Gram négatif, les pompes de type RND (*resistance-nodulation and cell division*) peuvent exporter un nombre élevé de molécules à activité antibiotique, de structures très différentes, mais également des biocides comme le triclosan. Ceci explique que l'utilisation de ces détergents peut sélectionner, à la suite d'un seul événement mutationnel dans un gène de régulation, des bactéries d'emblée multirésistantes. En effet, ces pompes, qui doivent être considérées comme les reins de la bactérie, exportent les produits toxiques pour la cellule, principalement ceux provenant du catabolisme et les gènes de structure

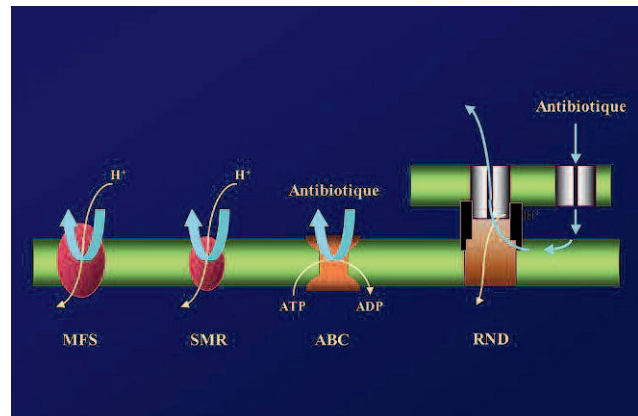


Figure 3 : Familles de pompes d'efflux. La famille ABC (pour ATP Binding Cassette) rassemble des transporteurs primaires qui hydrolysent l'ATP. Les familles RND (pour Resistance Nodulation and cell Division), MSF (pour Major Facilitation Superfamily) et SMR (pour Small Multidrug Resistance) correspondent à des transporteurs secondaires utilisant le gradient de protons (H⁺) comme source d'énergie. La figure montre les trois composantes du transporteur RND : une protéine de transport dans la membrane, une protéine dans le périplasma formant un canal et reliant les deux membranes et une protéine dans la membrane externe de type porine, expulsant le substrat.

correspondants sont faiblement exprimés. Leur expression est régulée, de façon positive ou négative, et une mutation dans un des gènes de régulation (répresseur, activateur, système à deux composantes) entraînera la surexpression de la pompe et la résistance aux divers substrats. Ainsi donc, le plus petit événement génétique concevable, une mutation ponctuelle, peut entraîner la résistance à un nombre élevé de classes d'antibiotiques en une seule étape.

Résistance additive

Si la recherche pharmaceutique a découvert peu de nouvelles classes d'antibiotiques au cours des dernières décennies (en fait uniquement les oxazolidinones au cours des quarante dernières années), elle a amélioré l'activité des molécules, leurs propriétés pharmacocinétiques et diminué leur toxicité. Par ailleurs, la tendance en thérapeutique des maladies infectieuses est aux traitements plus courts à des posologies plus élevées, notamment pour diminuer la sélection de bactéries résistantes. C'est pourquoi, en cas de prescription, notamment par voie locale, les bactéries doivent faire face à un bouleversement transitoire mais brutal et important de leur environnement. Ceci est par exemple la situation après prescription par voie orale d'antibiotiques ne franchissant pas la barrière digestive, comme les glycopeptides ou les macrolides et apparentés. Pour faire face, les bactéries associent fréquemment deux gènes conférant la résistance à la même classe d'antibiotiques par des mécanismes différents. Dans le cas, par exemple, de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des tétracyclines (tableau 3), ces bactéries combinent la résistance par efflux [tet (K)] avec celle par protection de la cible [tet (M)] et le niveau du phénotype résultant est très précisément l'addition de ceux des deux phénotypes de résistance isolés.

Résistance coopérative

Dans d'autres systèmes de résistance, la combinaison de deux mécanismes différents de résistance à la même classe d'antibiotiques peut aboutir à une résistance plus élevée que celle due à la simple superposition des deux composants de l'association, comme pour l'érythromycine chez *Escherichia coli* (tableau 4). Des bactéries de cette espèce, isolées du tube digestif de malades recevant de l'érythromycine par voie orale, hébergent soit le gène *ereB* conférant la résistance par hydrolyse de la molécule, soit le gène *ermB* qui dirige la synthèse d'une méthylase de l'ARN 23S, qui modifie le site de fixation de l'antibiotique sur sa cible, soit les deux gènes. La combinaison des deux mécanismes est synergique et confère de très hauts niveaux de résistance à l'érythromycine, qui sont nécessaires, compte tenu des très fortes concentrations de l'antibiotique dans le tube digestif des patients (Andremont *et al.* 1986; Arthur & Courvalin, 1986).

GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE

Les gènes de résistance sont transitoirement utiles aux bactéries et il est donc logique qu'ils soient transférables et fréquemment portés par des éléments génétiques mobiles, le raisonnement devant s'appliquer au niveau de la population bactérienne et non de la bactérie isolée.

Facilitation du transfert de la résistance

Certains transposons ont une structure modulaire telle qu'un antibiotique auquel ils confèrent la résistance, peut stimuler spécifiquement leur transfert de bactérie à bactérie. Les transposons conjugatifs, qui sont des éléments génétiques mobiles très répandus chez les cocci à Gram positif (entérocoques, streptocoques y compris les pneumocoques), contiennent le gène *tet* (M) qui, comme nous l'avons vu, confère la résistance à la tétracycline. Ce déterminant de résistance est présent soit seul, soit, comme dans le cas de Tn1545, associé à d'autres gènes de résistance aux macrolides et aux aminosides (Courvalin & Carlier, 1987). L'exposition de bactéries hébergeant Tn1545 à de faibles concentrations de tétracycline aboutit à une augmentation de 10 à 100 fois de la fréquence du transfert de l'élément et ceci, tant *in vitro* qu'*in vivo* dans le tube digestif de souris gnotobiotiques (Doucet-Populaire *et al.* 1991). Ceci souligne, s'il en était besoin, les effets délétères de la supplémentation par les antibiotiques de l'alimentation animale. En effet ces pratiques, non seulement sélectionnent, dans le tube digestif des animaux, des bactéries résistantes à l'antibiotique utilisé qui peuvent ensuite coloniser l'homme, mais permettent également la dissémination de la résistance pas seulement à celui-ci mais aussi à d'autres classes de molécules. Ces pratiques, qui ont été bannies en Europe en l'an 2000 mais qui perdurent dans d'autres régions du monde, sont d'autant plus regrettables que le transfert de gènes de résistance de bactéries animales à bactéries humaines a été également démontré dans le tube digestif des souris, y compris en l'absence d'antibiotique (Moubareck *et al.* 2003).

Induction de la transformation chez *Streptococcus pneumoniae*

La transformation naturelle est la capacité qu'ont les bactéries qui appartiennent à certaines espèces (*S. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Neisseria spp.*) et qui sont en état de compétence d'incorporer de l'ADN nu de l'environnement (Maynard Smith *et al.* 1991). Il a été montré récemment que de faibles concentrations de certains aminosides ou fluoroquinolones (ces dernières molécules sont très utilisées dans le monde animal notamment chez les volailles et les poissons d'élevage) peuvent induire de façon très efficace l'état de compétence chez *S. pneumoniae* sans tuer les bactéries (Prudhomme *et al.* 2006). Il apparaît donc que le stress induit par les antibiotiques augmente le taux d'échange génétique y compris celui des gènes conférant la résistance.

Gène	S. aureus	
	Tétracycline	Minocycline
Aucun	1	0,4
<i>tet</i> (K)	115	0,8
<i>tet</i> (M)	91	10,4
<i>tet</i> (K) + <i>tet</i> (M)	210	12,8

Tableau 3 : Moyenne géométrique des CMI_s (mg/L) des tétracyclines contre *S. aureus* hébergeant différents gènes *tet*

Gène	Erythromycine	Pristinamycine
Aucun	4	2
<i>ereB</i>	128	2
<i>ermB</i>	16	2
<i>ereB</i> + <i>ermB</i>	1024	2

Tableau 4 : CMI_s (mg/L) de l'érythromycine contre *E. coli* hébergeant divers gènes de résistance.

CONCLUSION

Comme nous venons de le voir, il existe une multiplicité de mécanismes biochimiques et de systèmes génétiques permettant aux bactéries d'échapper à l'activité des antibiotiques. Cette diversité, combinée à l'utilisation extensive et fréquemment abusive des antibiotiques, rend compte de l'évolution vers la résistance des bactéries observée, principalement, au cours des dernières décennies. Cependant, l'étude de cette résistance a permis d'intéressantes découvertes, tant au niveau de l'organisation de l'information génétique des procaryotes (transposons, conjugatifs, intégrons) que du contrôle de son expression (Depardieu *et al.* 2007).

BIBLIOGRAPHIE

- Andremont, A., Gerbaud, G., Courvalin, P. 1986. Plasmid-mediated high-level resistance to erythromycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 29: 515 – 518.
- Arthur, M. & Courvalin, P. 1986. Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 30: 694 – 700.
- Courvalin, P. & Carlier, C. 1987. Tn1545: A conjugative shuttle transposon. *Mol Gen Genet.* 206: 259 – 264.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., Courvalin, P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev.* 20: 79 – 114.
- Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Dosbaa, I., Andremont, A., Courvalin, P. 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 185 – 187.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., Lambert, T. 2005. Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2949 – 2953.
- Goldstein, F.W. 1999. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: selection by both β -lactam and non β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 44: 141 – 144.
- Maynard Smith, J., Dowson, C.G., Spratt, B.G. 1991. Localized sex in bacteria. *Nature* 349: 29 – 31.
- Moubareck, C., Bourgeois, N., Courvalin, P., Doucet-Populaire, F. 2003. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 2993 – 2996.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.-P. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 313: 89 – 92.