

LES SYSTÈMES D'EFFLUX ACTIFS BACTÉRIENS : CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION POUR QUELLES PERSPECTIVES ?

BACTERIA EFFLUX PUMPS: CHARACTERIZATION AND MOLECULAR MODELISATION FOR WHICH PERSPECTIVES?

Par Julio AIRES¹

(Communication présentée le 6 octobre 2011)

RÉSUMÉ

Depuis la découverte et l'utilisation des antibiotiques, l'antibiothérapie a permis le traitement d'un grand nombre d'infections bactériennes, voire parasitaires et d'améliorer l'espérance de vie humaine. Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques a conduit inexorablement au développement progressif de résistances bactériennes. Parmi les stratégies développées par les bactéries pour s'affranchir de l'action souvent létale des antibiotiques, l'imperméabilité de la paroi et en particulier les phénomènes d'efflux actifs des antibiotiques participent à l'émergence de résistances. Les pompes à efflux sont des protéines bactériennes ubiquitaires qui reconnaissent de façon primaire des substrats physiologiques. L'activité de transport opportuniste des antibiotiques par ces systèmes, en association avec d'autres mécanismes de résistance, est responsable de la sélection de souches multi-résistantes de haut niveau à l'origine d'impasses thérapeutiques. Les données récoltées par la caractérisation et la modélisation moléculaire du fonctionnement des pompes à efflux bactériennes, permettent actuellement de définir des stratégies qui pourront conduire au développement de nouvelles molécules capables d'inhiber ces systèmes. En attendant, des méthodes applicables en routine dans les laboratoires hospitaliers doivent être proposées pour détecter les pompes à efflux et limiter ainsi les phénomènes de résistance de haut niveau, redoutés en thérapeutique.

Mots-clés : pompes à efflux, bactéries, résistance aux antibiotiques, clinique, inhibiteurs de pompes à efflux.

SUMMARY

Since their discovery, antibiotic have cured a large number of bacterial infections and improved human life expectancy. However, the use of antibiotics has also led inexorably to the progressive development of bacterial resistance. Among the strategies developed by bacteria to overcome the action of antibiotics, impermeability of the wall and especially active efflux of antibiotics contributed to the emergence of resistance. Efflux pumps are ubiquitous bacterial proteins that recognize in the first place physiological substrates. However, opportunistic antibiotic transport activity by these systems, combined with other resistance mechanisms are responsible for the selection of strains highly resistant to multiple antibiotics, resulting in therapeutic failures. Research data provided by the characterization and molecular modelization of bacterial efflux pumps has been used to define strategies which may lead to the development of new molecules able to inhibit these systems. Meanwhile, new methods for the routine detection of efflux pumps by hospital laboratories are needed to limit the development of high-level multidrug resistance.

Keywords: efflux pumps, bacteria, antibiotic resistance, clinics, efflux pumps inhibitors.

(1) Université Paris Descartes, EA4065, Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 avenue de l'observatoire, 75006 Paris.

INTRODUCTION

Fleming, Florey et Chain reçoivent le prix Nobel de Physiologie-Médecine pour « la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses » en 1945. L'isolement des premiers antibiotiques dans les années 1940 à partir de cultures de microorganismes a conduit au développement d'un certain nombre de molécules issues de la modification chimique des substances naturelles connues (molécules « héli-synthétiques ») ou entièrement issues de la synthèse chimique (« agents antibactériens »). Aujourd'hui la tuberculose, la pneumonie, la diphtérie, la syphilis ou encore le tétanos contre lesquelles il n'existait aucun remède il y a 60 ans, peuvent désormais être traités grâce aux antibiotiques. Si l'avènement de l'antibiothérapie permit de lutter contre un certain nombre de maladies infectieuses, l'utilisation des antibiotiques s'est accompagnée de l'émergence de bactéries résistantes. Ces résistances peuvent être le résultat de mutations spontanées avec activation ou modification de déterminants génétiques existants ou la conséquence de l'acquisition de gènes situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmide, transposon par exemple). Elles peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques antibiotiques de structure voisine, mais on observe depuis plusieurs années l'émergence de résistances croisées à des molécules de structures et de modes d'actions différents.

Les bactéries ont développé différentes stratégies pour s'affranchir de l'action létale des antibiotiques qui s'appuient sur trois types de mécanismes de résistance (*figure 1*) :

- 1) la modification de la cible des antibiotiques (mutation de l'ADN gyrase et de la topo-isomérase IV entraînant l'inefficacité des fluoroquinolones, ou encore altération de la cible ribosomale des macrolides ou des tétracyclines) ;
- 2) la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques (bêta-lactamases, aminosides phosphotransférase, aminosides adényltransférase, aminosides acétyltransférase) ;
- 3) l'imperméabilité de la paroi bactérienne. Ce dernier mécanisme contribue à diminuer la concentration d'antibiotique en contact avec la cible : ce phénomène peut avoir lieu par modification des composants de la paroi (porines) qui réduisent la vitesse de diffusion des antibiotiques et/ou par leur expulsion de manière active vers le milieu extracellulaire *via* des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux.

Cette communication se limitera aux perspectives apportées en thérapeutique par la caractérisation et la modélisation moléculaire des pompes à efflux (pour plus de détail sur les différents aspects des systèmes d'efflux bactériens, j'invite les lecteurs à consulter parmi les nombreuses excellentes revues sur le sujet celles de Li & Nikaido, 2004 et Li & Nikaido, 2009).

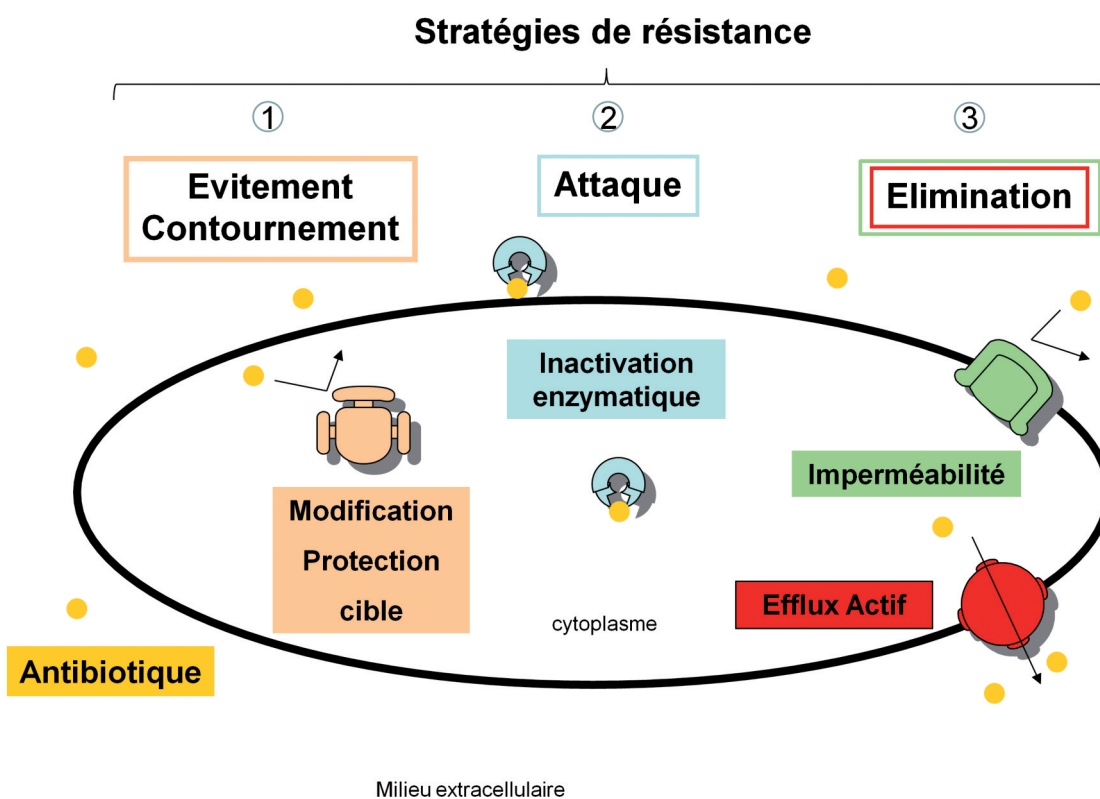


Figure 1 : Principaux mécanismes de résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques.

POMPES À EFFLUX BACTÉRIENNES

Si les premières pompes d'efflux ont été décrites comme des transporteurs d'efflux spécifiques conférant à *Escherichia coli* une résistance vis-à-vis de la tétracycline (Levy & McMurry, 1978), d'autres transporteurs ont été décrits, qui sont capables de prendre en charge des composés de structures très différentes (Li & Nikaido, 2004 ; Li & Nikaido, 2009). Ces systèmes se révèlent être ubiquitaires et sont largement représentés dans le monde bactérien : on les retrouve chez les bactéries non cultivables, pathogènes ou non pathogènes, de l'environnement. D'un point de vue physiologique, les bactéries utilisent les pompes à efflux comme mécanismes de défense et de détoxification vis-à-vis des composés toxiques de l'environnement (métaux lourds, sels biliaires, solvants organiques, antiseptiques, ...). On considère que les pompes à efflux participent également à l'élimination des métabolites endogènes ou à la sécrétion de produits cellulaires (toxines, bactériocines, facteurs de virulence, ...) (Li & Nikaido, 2004 ; Li & Nikaido, 2009).

Les différents transporteurs membranaires ont pu être classés en se basant sur des données fonctionnelles et phylogénétiques (<http://www.tcdb.org/>). Les transporteurs bactériens de type pompe à efflux capables de transporter les antibiotiques les plus importants sont regroupés dans deux superfamilles : celle des ABC (*ATP-binding-cassette*) transporteurs (transporteurs primaires) et celle des transporteurs utilisant le potentiel électrochimique membranaire [transporteurs secondaires de la famille des SMR (*Small*

Multidrug Resistance), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance/Nodulation/cell Division*), MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*)] (**figure 2**). On distingue ainsi les pompes à efflux utilisant leur énergie soit par la dissipation d'un gradient de protons (SMR, MFS, RND) ou d'ions Na⁺ (MATE), soit par hydrolyse de l'ATP (ABC) (**figure 2**).

La topologie des pompes à efflux (c'est-à-dire la façon dont la ou les protéine(s) se dispose(nt) au travers de la membrane) est différente selon les bactéries considérées (**figure 2**). Les pompes à efflux présentes chez les bactéries à Gram positif ne sont constituées que de transporteurs localisés dans la membrane cytoplasmique, directement responsables de l'efflux vers l'espace sous-jacent au peptidoglycane, à partir duquel les molécules peuvent diffuser vers l'extérieur. Chez les bactéries à Gram négatif, du fait de la compartimentation de la paroi, on trouve des systèmes d'efflux mettant en jeu des complexes protéiques tripartites (systèmes appartenant à la famille des RND). En effet, la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée de deux membranes (la membrane cytoplasmique et la membrane externe entourant le peptidoglycane) qui délimitent un compartiment intermédiaire appelé l'espace périplasmique. Cette organisation particulière implique que le transporteur localisé sur la membrane cytoplasmique soit associé à une protéine située au niveau de la membrane externe par l'intermédiaire d'une protéine de liaison. Ces trois protéines s'assemblent pour former un canal traversant l'espace périplasmique et les deux membranes (**figure 2**).

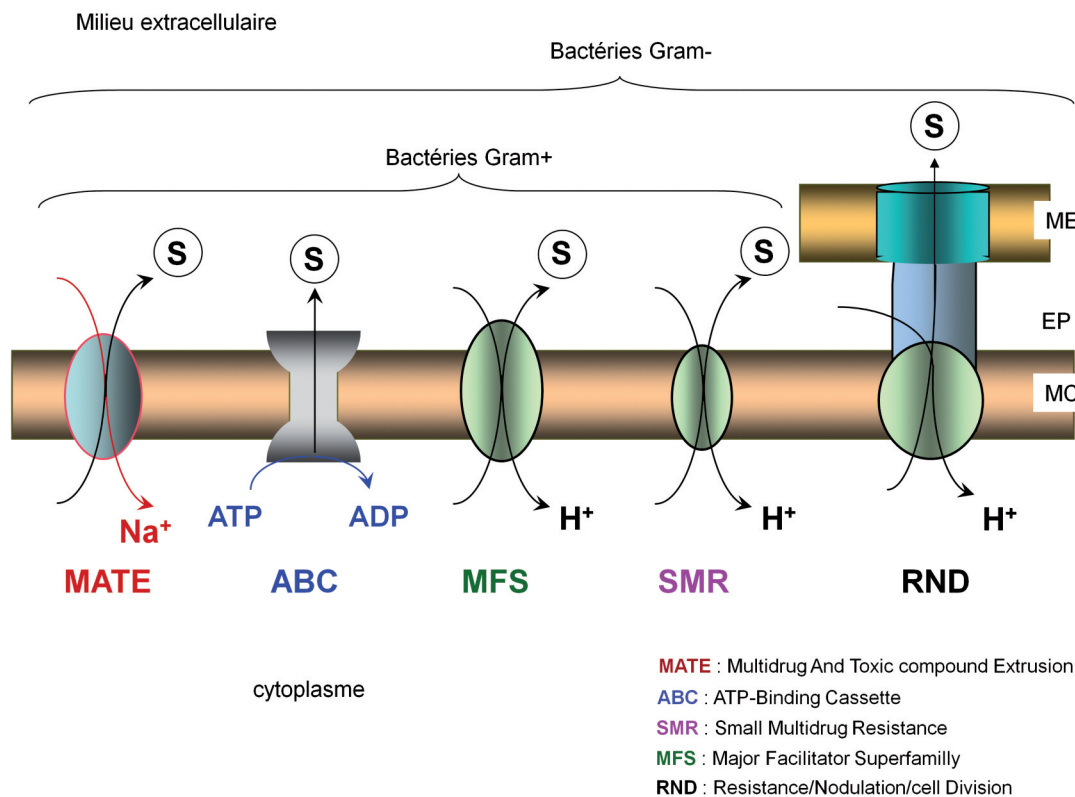


Figure 2 : Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes. ME, membrane externe ; EP, espace périplasmique ; MC, membrane cytoplasmique ; S, substrat.

CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION

Les transporteurs sont des protéines dont la structure est variable mais qui contiennent toutes des segments transmembranaires (de 4 à 14). Les alignements de séquences primaires et secondaires des transporteurs suggèrent l'existence de protéines codées par des gènes ancestraux (Borges-Walmsley *et al.* 2003). D'un point de vue génétique, les gènes codant les transporteurs sont organisés en opérons. Ils sont le plus souvent sous l'influence d'un régulateur local, global, ou d'un système à deux composantes. Tout dysfonctionnement du régulateur peut conduire à une surexpression du système d'efflux qui se traduit par une augmentation du niveau de résistance bactérienne, évalué par la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI (mg/L). Certains transporteurs sont naturellement exprimés et apportent à la bactérie un niveau basal de résistance (**tableau 1**), d'autres sont inductibles (Li & Nikaido, 2004 ; Li & Nikaido, 2009).

Si certains transporteurs ne reconnaissent qu'une ou deux classes ou familles d'antibiotiques, la plupart d'entre eux sont capables d'expulser des antibiotiques appartenant à des classes

très différentes mais également des métaux lourds, des sels biliaries, des solvants organiques, certains antiseptiques comme les ammoniums quaternaires, des colorants (pour une liste complète des substrats transportés par les différentes familles de transporteurs bactériens, voir les revues de Li & Nikaido, 2004 et Li & Nikaido, 2009).

Un certain nombre de stratégies ont été mises en œuvre afin d'obtenir des informations structurales, fonctionnelles et biochimiques sur les pompes à efflux. Parmi les approches utilisées pour caractériser les pompes à efflux, on peut citer l'étude de protéines chimériques (Elkins *et al.* 2002), l'utilisation des techniques de mutagenèse dirigée (Aires *et al.* 2001) ou encore les expériences de reconstitution *in vitro* (Aires & Nikaido, 2005), qui ont permis de mieux comprendre d'un point de vue fondamental l'organisation et le fonctionnement des efflux. Plus récemment, la cristallographie a permis d'obtenir des structures 3D des transporteurs représentant les différentes familles d'efflux (excepté pour la famille MATE) (Li & Nikaido, 2009). Les structures cristallines de fortes résolutions ont montré des systèmes organisés en homodimères ou en homotrimères (RND). Dans le cas du système RND tripartite, spécifique des bactéries Gram négatif, les trois composantes protéiques ont été cristallisées, permettant ainsi de proposer un modèle d'assemblage (Li & Nikaido, 2009). De la même manière, les structures cristallographiques de certains transporteurs en présence de différents ligands (Yu *et al.* 2005), analogues d'antibiotiques pour la plupart, ont permis de mettre en évidence les régions d'interaction moléculaire et de proposer un trajet d'efflux des substrats au sein du transporteur (Li & Nikaido, 2009). L'accumulation des informations obtenues par la cristallographie permet de proposer des modèles de l'accès, de la reconnaissance et de l'expulsion des substrats (Seeger *et al.* 2008).

Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI, mg/L)			
Phénotype de résistance (mutation)	Souche sauvage	Souche surexprimant pompe à efflux RND MexAB-OprM	Souche surexprimant pompe à efflux RND MexAB-OprM + 20 mg/L IPE
Absence de mutation	0,25	2	0.03
gyrA (Thr83->Ile)	2	8	0.5
gyrA (Thr83->Ile)			
parC(Ser87->Leu)	4	32	2
gyrA (Thr83->Ile)			
gyrA (Asp87->Tyr)	16	128	8
parC(Ser87->Leu)			

Tableau 1 : *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux fluoroquinolones (lévofloxacine) : impacts *in vitro* (CMI) après sélection de mutants résistants (*gyrA*, *parC*) en présence ou non d'un inhibiteur de pompes d'efflux (IPE). *gyrA* : gène codant l'ADN gyrase A cible des fluoroquinolones, *parC* : gène codant la topo-isomérase IV, cible des fluoroquinolones.

IMPACT DE L'EFFLUX ACTIF SUR LA RÉSISTANCE CLINIQUE AUX ANTIBIOTIQUES

Les transporteurs reconnaissent de façon primaire des substrats physiologiques et leur activité de transport des antibiotiques est le plus souvent opportuniste. À l'origine de résistances de bas niveau, les pompes d'efflux chez les bactéries posaient peu de problèmes en antibiothérapie. C'est la raison pour laquelle leur présence dans les parois bactériennes a longtemps été négligée et leur impact en clinique peu étudié. Cependant, la co-expression de plusieurs pompes à efflux peut entraîner une multi-résistance ou une résistance de haut niveau lorsque les transporteurs reconnaissent un même antibiotique. Associé à d'autres mécanismes de résistance, l'efflux actif est responsable de la sélection de souches multi-résistantes de haut niveau à l'origine d'impasses thérapeutiques (**figure 3**). C'est par exemple le cas de la synergie entre l'efflux et des mutations dans les gènes codant des topo-isomérases (comme l'ADN gyrase A et/ou la topo-isomérase IV) dans la résistance aux fluoroquinolones (**tableau 1, figure 3**) : l'exportation des fluoroquinolones favorise la sélection de mutants par exposition à des concen-

trations insuffisantes de l'antibiotique (Lomovskya *et al.* 2001). On peut également citer comme exemple la résistance de *Pseudomona aeruginosa* aux bêta-lactamines, qui résulte le plus souvent de la combinaison d'une faible perméabilité membranaire, de la présence et de la surexpression du transporteur MexAB-OprM et de l'activité d'une bêta-lactamase de type céphalosporinase ou AmpC (Lomovskya *et al.* 1999). Il faut rappeler que les gènes encodant les pompes à efflux sont parfois situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) potentiellement transférables, et posent le problème de la dissémination épidémique ou mondiale de la résistance.

QUELLES PERSPECTIVES EN THÉRAPEUTIQUE ?

Aujourd'hui, notamment grâce aux études de « relation structure-activité » et à l'obtention des structures 3D des transporteurs, nous avons approfondi nos connaissances sur le fonctionnement moléculaire des pompes à efflux bactériennes. Cela permet d'envisager des stratégies dans le but de rendre inefficace l'action des pompes à efflux en tant que mécanisme de résistance aux antibiotiques. L'idée repose sur la réduction ou la suppression des phénomènes d'efflux des antibiotiques. Dans cet objectif, les différentes voies de recherche sont : le développement de nouvelles molécules qui ne sont pas exportées par les systèmes d'efflux, le développement d'inhibiteurs des pompes à efflux (IPE) sur le modèle des inhibiteurs calciques (vérapamil) ou celui des antagonistes de la calmoduline (fluphénazine). La première approche repose sur la modification chimique d'antibiotiques connus afin de diminuer leur affinité et donc leur élimination par les pompes, ou d'augmenter leur vitesse de pénétration afin de saturer l'ac-

tion d'efflux. Cette approche peut s'avérer efficace pour une molécule mais pas pour une classe d'anti-infectieux. Le développement d'IPE est la voie de recherche actuellement privilégiée. En particulier la co-administration d'un antibiotique avec un IPE a prouvé son efficacité par le passé avec l'association de l'amoxicilline et d'un inhibiteur de bêta-lactamases comme l'acide clavulanique. L'utilisation d'IPE a pour objectifs de diminuer le niveau de résistance naturelle, de retrouver le niveau de sensibilité naturelle chez les mutants d'efflux et de diminuer la fréquence d'apparition de mutants à haut niveau de résistance à l'origine d'impasses thérapeutiques. Il existe des IPE déjà connus et utilisables *in vitro* (vérapamil, réserpine, certains anticancéreux) mais leur utilisation *in vivo* est souvent remise en cause par leur pharmacocinétique inadaptée ou leur toxicité. La découverte de nouvelles molécules IPE passe par le criblage de banques de produits naturels ou synthétiques. Cependant, l'activité *in vivo* et *in vitro* de certains IPE a été étudiée sur un certain nombre de souches bactériennes dont le mécanisme moléculaire de résistance était caractérisé : les IPE ne sont pas actifs sur tous les systèmes d'efflux et/ou ne présentent pas la même activité vis-à-vis des antibiotiques (Li & Nikaido, 2009). Par conséquent, compte tenu du nombre et de la diversité des pompes à efflux décrites pour une même espèce bactérienne, l'inhibition d'un seul type de transporteurs présente un intérêt limité. En terme de perspectives thérapeutiques, le défi va consister à développer un IPE actif sur :

- 1) des pompes similaires présentes chez différentes espèces bactériennes,
- 2) des pompes différentes ayant des substrats équivalents ou
- 3) des pompes différentes ayant des substrats différents.

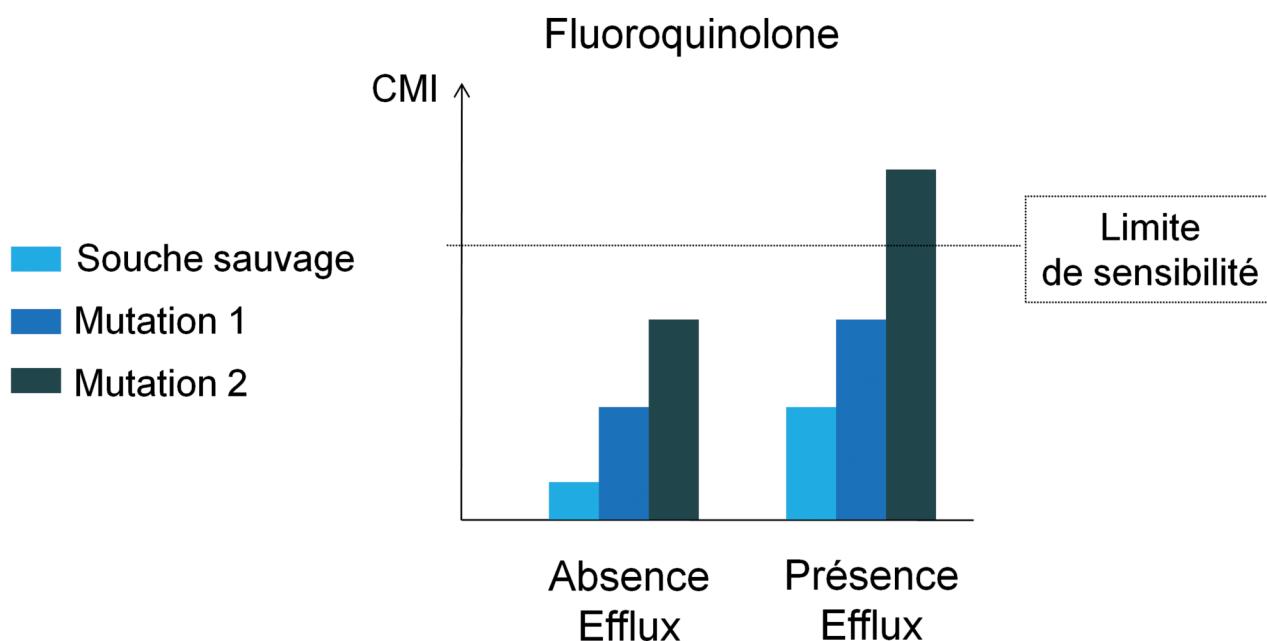


Figure 3 : Résistance aux fluoroquinolones : impact *in vitro* des pompes à efflux (CMI, concentration minimale inhibitrice, mg/L) après sélection de mutants résistants.

CONCLUSION

L'antibiothérapie a permis le traitement d'un grand nombre d'infections bactériennes et d'améliorer l'espérance de vie humaine. Néanmoins, l'utilisation des antibiotiques a conduit inexorablement au développement progressif de résistance bactérienne. Si les premiers systèmes d'efflux actifs bactériens ont été décrits il y a une trentaine d'années, c'est de nos jours, qu'associés à d'autres mécanismes spécifiques comme l'inactivation enzymatique ou la modification d'affinité de la cible, ils jouent pleinement leur rôle dans la sélection de souches multi-résis-

tantes de haut niveau à l'origine d'impasses thérapeutiques. Les données récoltées par la caractérisation et la modélisation moléculaire du fonctionnement des pompes à efflux bactériennes, permettent actuellement de définir des stratégies qui pourront conduire au développement de nouvelles molécules capables d'inhiber ces systèmes. En attendant, des méthodes applicables en routine dans les laboratoires hospitaliers doivent être proposées pour la détection des pompes à efflux et limiter ainsi les phénomènes de résistance de haut niveau, redoutés en thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- Aires, J.R., Péchère, J.C., Van Delden, C., Köhler, T. 2002. Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 2169-2173.
- Aires, J.R. & Nikaido, H. 2005. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187: 1923-1929.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., Walmsley, A.R. 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J.* 376: 313-338.
- Elkins, C.A. & Nikaido, H. 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol.* 184: 6490-6498.
- Levy S.B. & McMurry L. 1978. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 276: 90-92.
- Li, X.Z. & Nikaido, H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64: 159-204.
- Li, X.Z. & Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria- An update. *Drugs* 69: 1555-1623.
- Lomovskaya, O., Lee, A., Hoshino, K., Ishida, H., Mistry, A., Warren, M.S., Boyer, E., Chamberland, S., Lee, V.J. 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 1340-1346.
- Lomovskaya, O., Warren, M., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland S., Renau, T., *et al.* 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 105-116.
- Seeger, M.A., von Ballmoos, C., Eicher, T., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., Pos, K.M. 2008. Engineered disulfide bonds support the functional rotation mechanism of multidrug efflux pump AcrB. *Nat Struct Mol Biol.* 15: 199-205.
- Yu, E.W., Aires, J.R., McDermott, G., Nikaido, H. 2005. A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump : a crystallographic and site directed mutagenesis study. *J Bacteriol.* 187:6804-6815.