

Mécanismes des Résistances Bactériennes

Philippe CRUAUD

philippe.cruaud@jvr.ap-hop-paris.fr

module de réanimation et pathologies infectieuses

22 mai 2003

Préambule

Catégorisation d'un antibiogramme

- **sensibles (S)** : probabilité de succès thérapeutique acceptable dans le cas d'un traitement systémique avec posologie recommandée
- **résistant (R)** : forte probabilité d'échec thérapeutique
- **intermédiaire (I)** : catégorie hétérogène à discuter à partir des connaissances des mécanismes de résistance et de l'infection

COMMENT DÉFINIR L'ACTIVITÉ D'UN ANTIBIOTIQUE ?

LES TROIS ELEMENTS DE BASE

L'agent infectieux

Sa virulence, sa résistance naturelle aux antibiotiques, sa capacité à acquérir une résistance aux antibiotiques...



Le malade

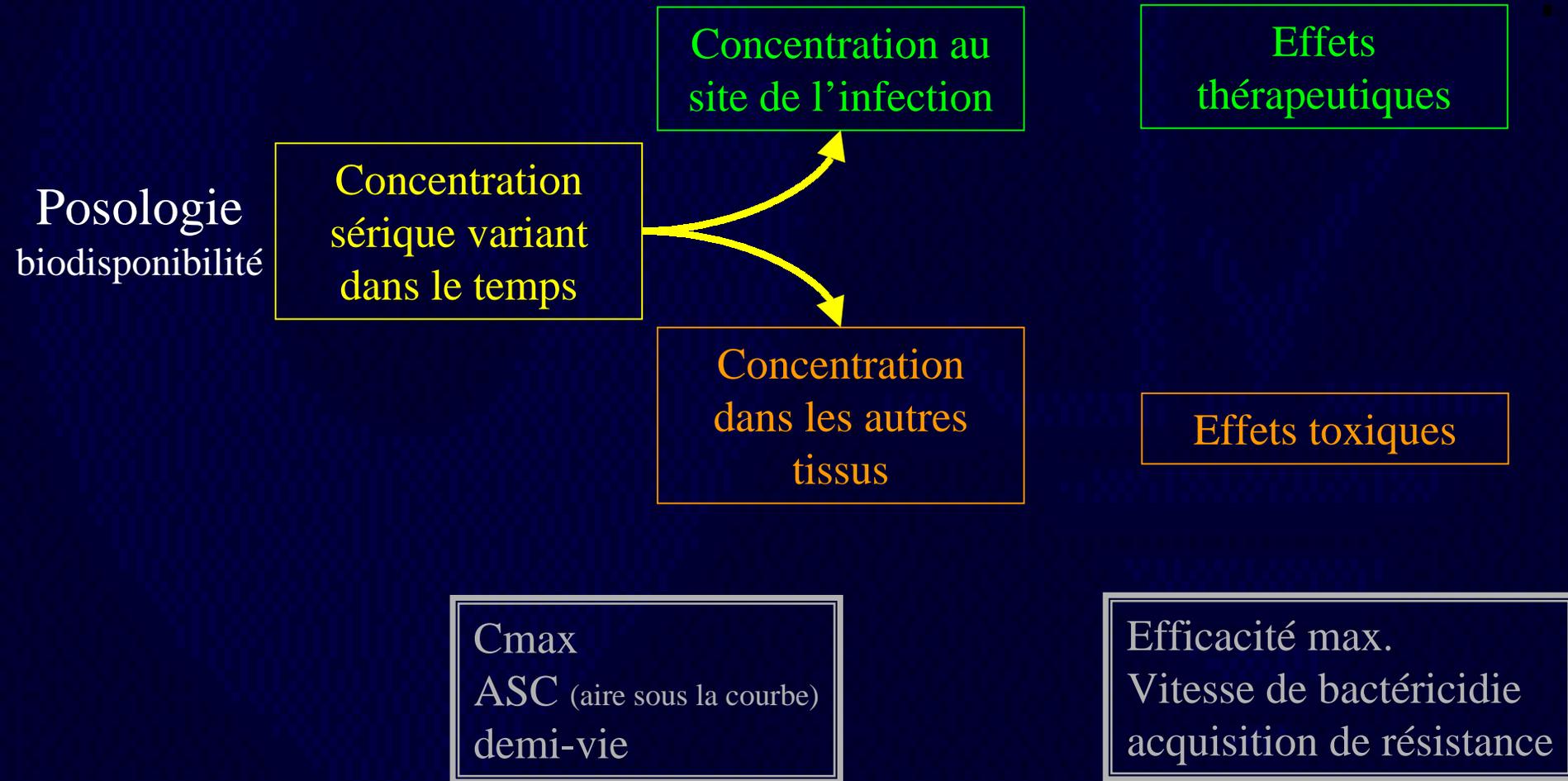
Le terrain, le site de l'infection (extra ou intracellulaire, milieu acide), la porte d'entrée, les localisations secondaires, le contexte écologique...



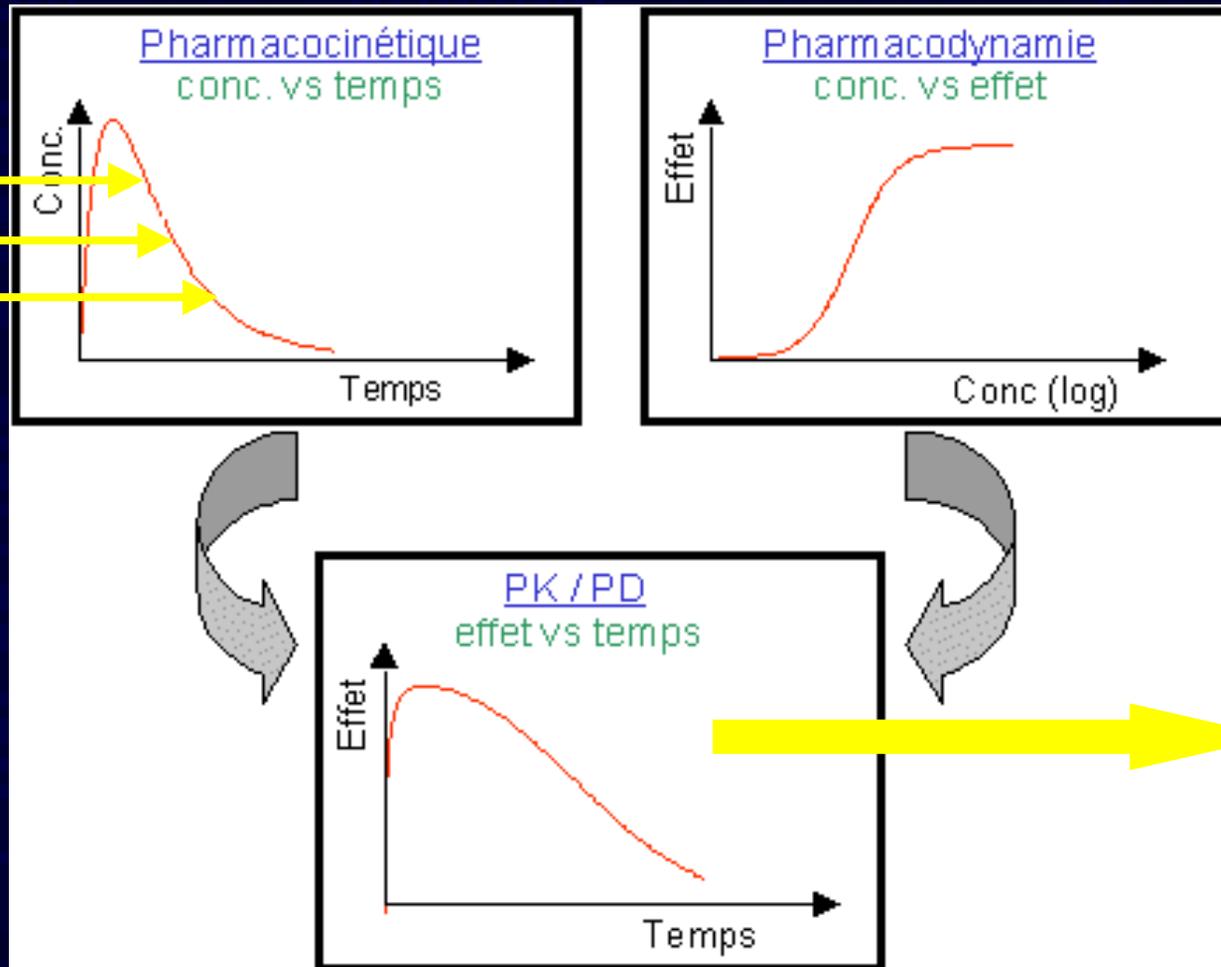
L'antibiotique

Son mode d'action, sa pharmacologie, son prix, les synergies possibles, l'impact écologique...

Pharmacocinétique Pharmacodynamie



AUTRE APPROCHE : PK/PD



Modèle
animal

prévention
résistance

Rappels

Structure bactérienne

La coloration de Gram



1



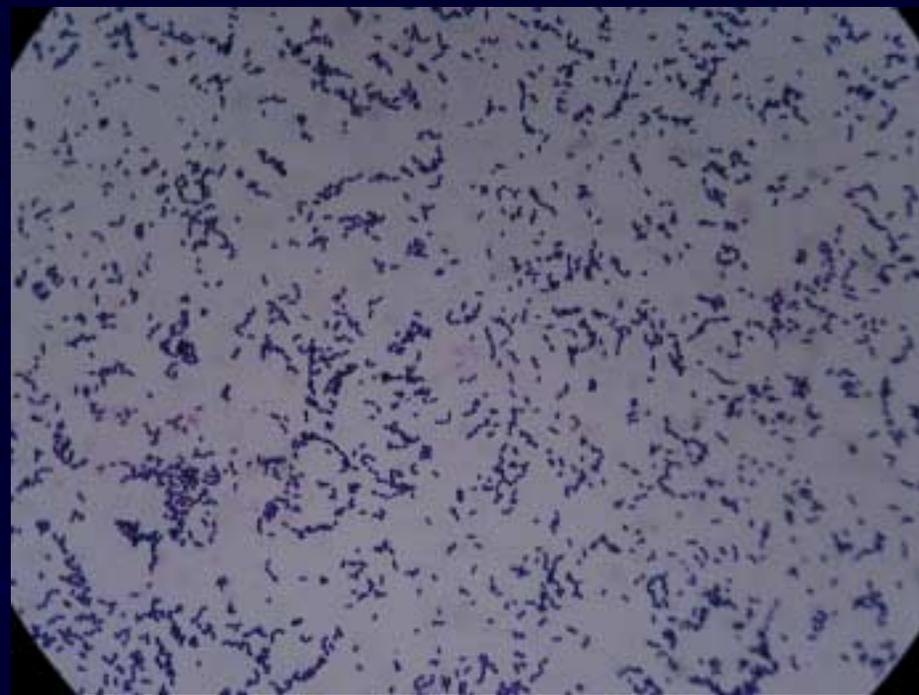
2



2

Gram positif

cocci

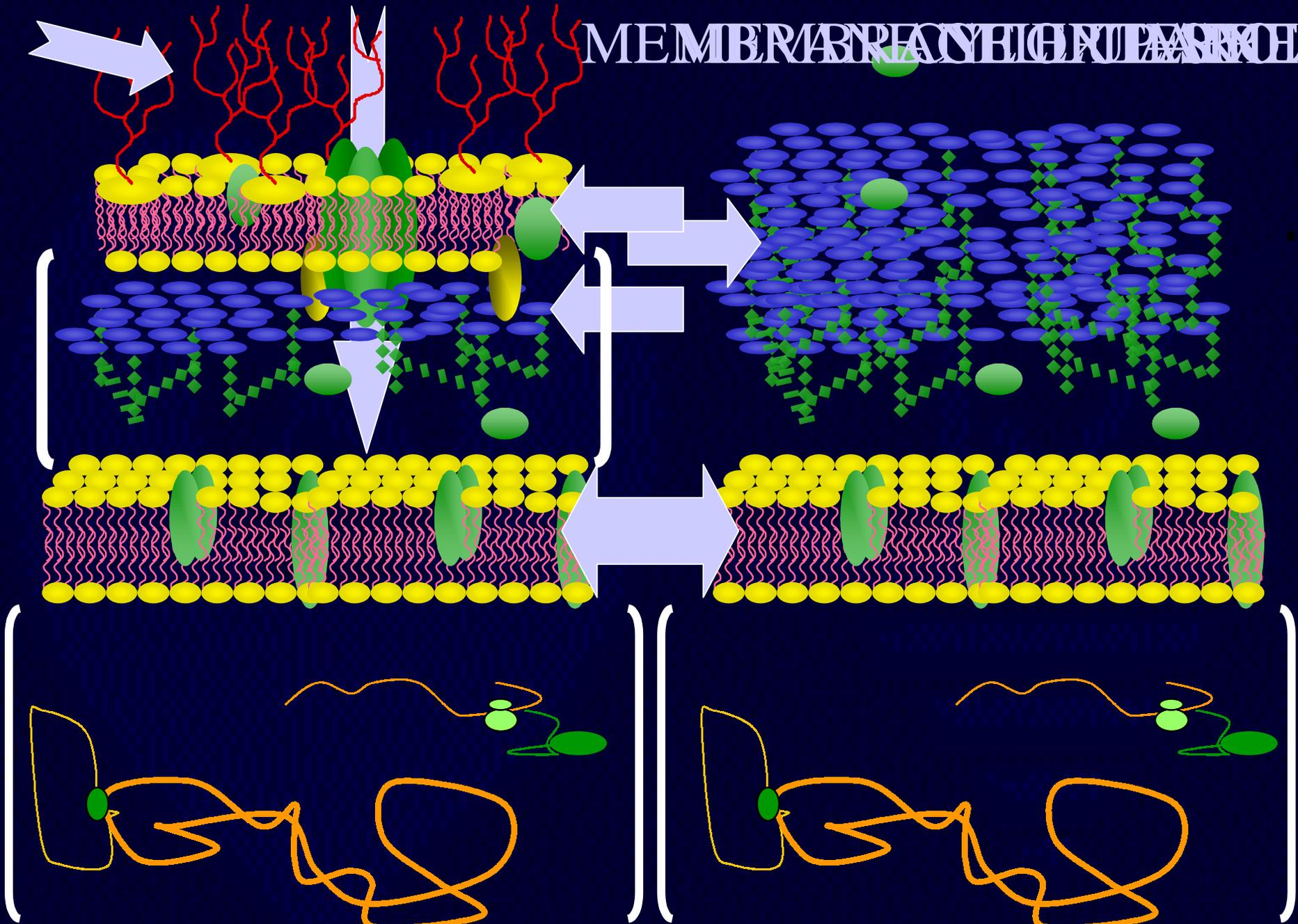


Gram négatif

bacilles



MEMBRANES CYTOLIQUES



Gram négatif

Gram positif

Généralités

Mécanismes de résistance des
bactéries aux antibiotiques

INTERACTION ANTIBIOTIQUES - BACTÉRIES

RESITANCE AUX ANTIBIOTIQUES

NATURELLE

ACQUISE

DIFFUSION

espaces péri-bactériens

FRANCHISSEMENT

membranes bactériennes

BACTERIE

FIXATION

cible bactérienne

● Antibiotique

DIFFUSION

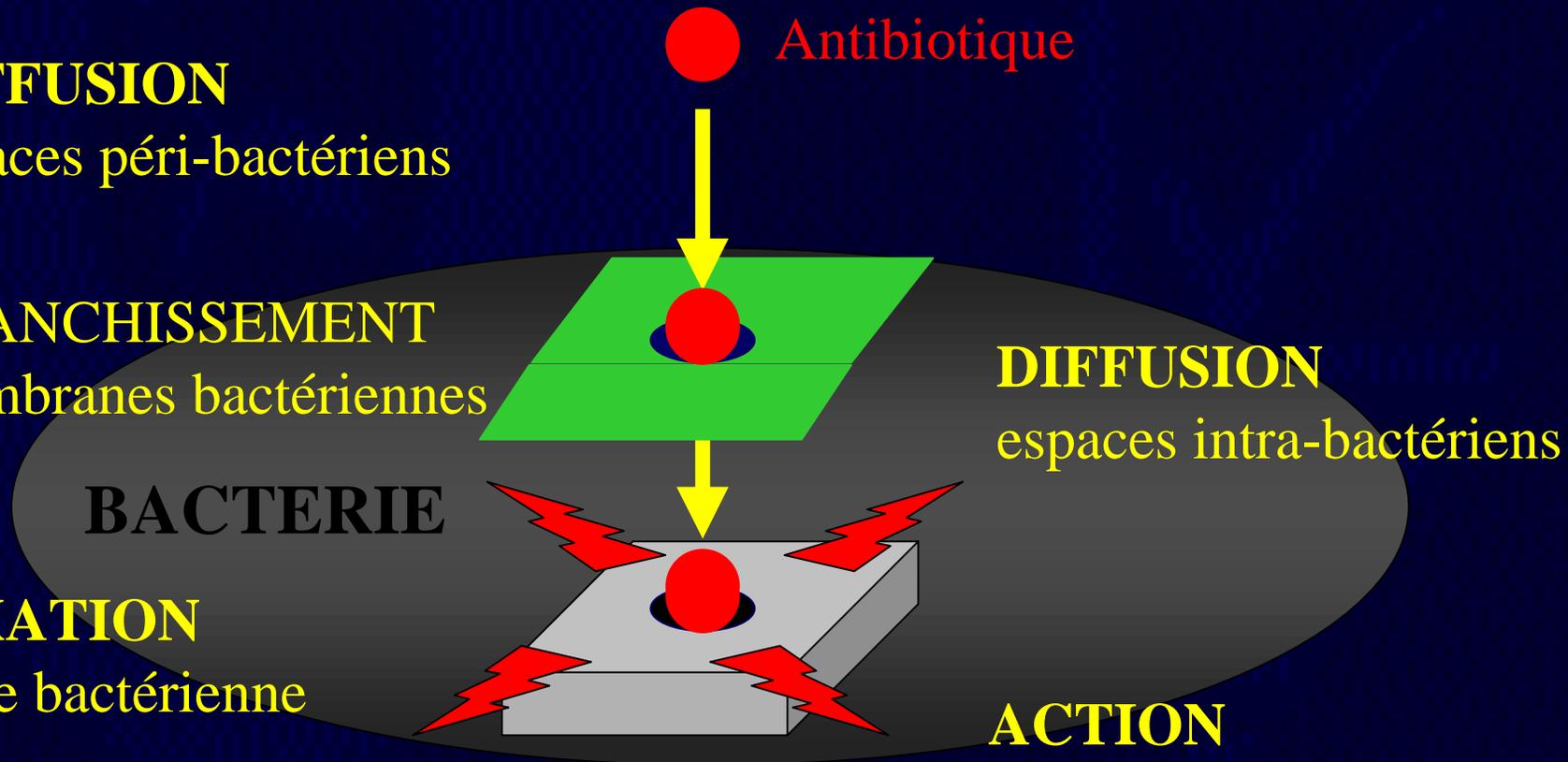
espaces intra-bactériens

ACTION

•bactériostatique

•bactéricide

Possibilité de tolérance



Trois mécanismes impliqués

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (II)

Modification de la cible

Naturelle

Absence de cible pour les mycoplasmes

Généralement :

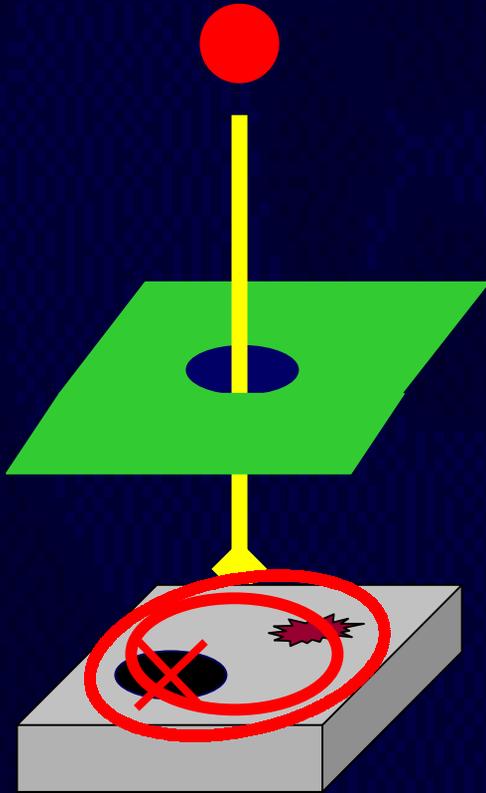
si cible originale avec perte d'affinité

Intermédiaire : augmentation des posologie

si **Acquis** le cible

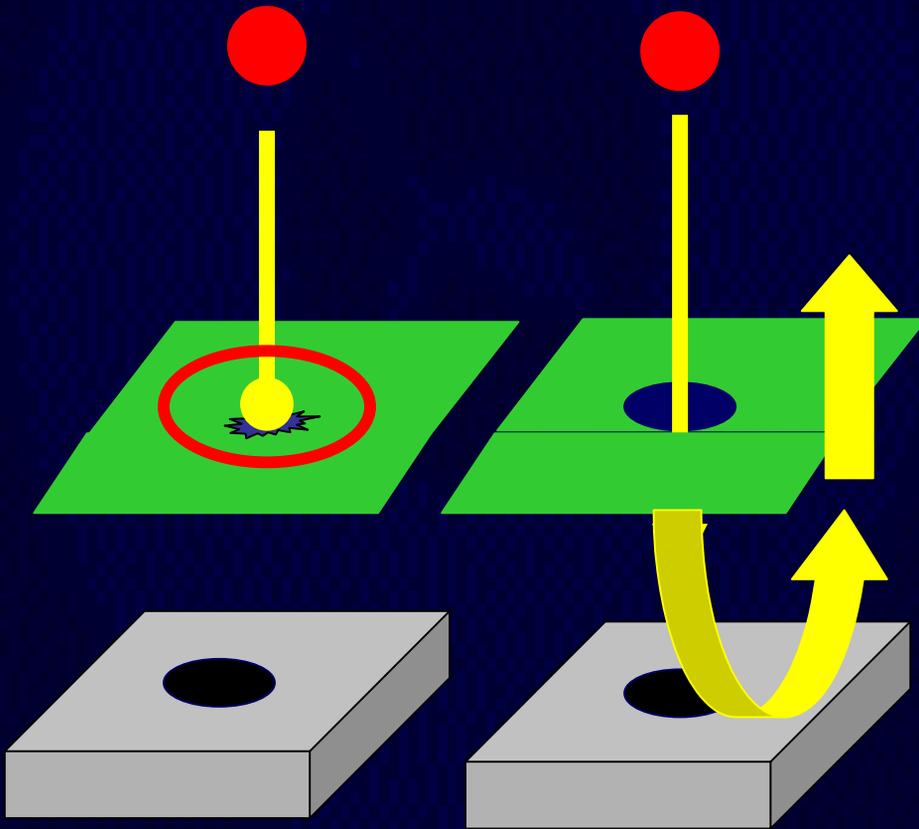
Résistant
Staphylocoques et méticillino résistance

Pneumocoques de sensibilité diminuée aux
bêtalactamines



RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (I)

Défaut de perméabilité - Efflux



Naturelle

Pénicilline G, V et M pour les Gram -

Aminosides et anaérobies (NB streptocoques)

Acquise

Pseudomonas aeruginosa et Imipénème

Gram positif et macrolides

RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES (II)

Action d'enzymes

Naturelle

Production de bêtalactamase

- céphalosporinases (non inhibées par IBL)

Pseudomonas

Entérobactéries (groupe 3 et 4)

quelques entérobactéries du groupe 1 mais sans expression

- pénicillinases (inhibées par IBL)

- Entérobactéries (groupe 2 et 4)

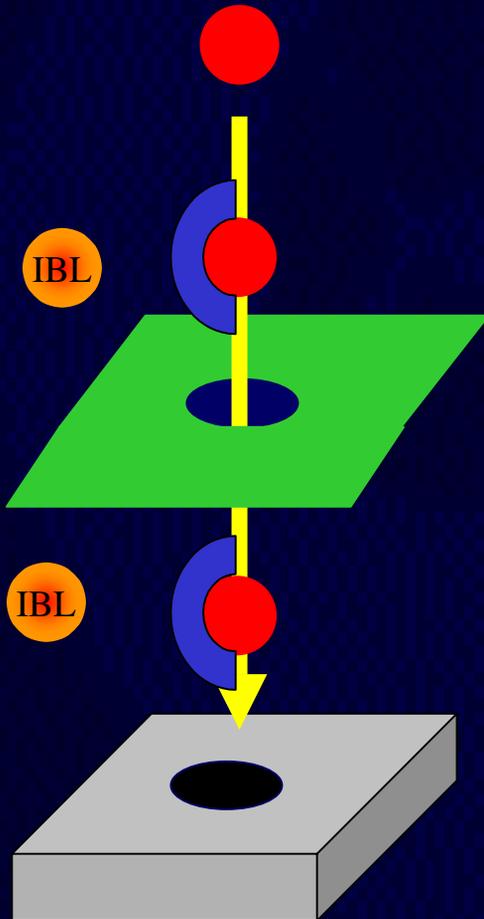
Acquise

Plasmides

codant pour des bêtalactamases (type pénicillinase)

TEM, SHV, OXA, PSE, etc.

mutants de pénicillinases (TRI et BLSE)



Généralité

Support génétique de la résistance
aux antibiotiques

Support génétique de la résistance

- Résistances naturelles

- chromosomique

- gènes d'expression (*ou de non expression*) constitutive
- gènes d'expression inductible (répression naturelle)

- Résistances acquises

- chromosomique

- modification de structure
- modification d'un gène de modulation

- plasmidique (de 1 à x copies)

- certaines expressions inductibles

- transposons, transformation

MUTATIONS

NOUVEAUX
GENES

↑
MUTATIONS

Mutations chez les bactéries

Mutations chez les bactéries

- Phénomène fréquent : pas de système de réparation ($1/10^5$ bp)
- mort ou survie de la bactérie
- en terme de résistance => modification d'un comportement métabolique inhibée par les antibiotiques



Sans ou peu
d'implication sur la voie
métabolique



Perte d'affinité de
l'antibiotique
(étapes successives)

Tuberculose : résistance aux antituberculeux

Estimation du nombre de mutants résistants dans des populations de 10^8 et 10^5 bacilles tuberculeux

(Canetti G., Grosset J Ann Institut Pasteur (1961), 101, 28)

Régime thérapeutique	Concentration intracavitaire du produit (mg/l)		Nombre de bacilles résistants dans une population de :	
	INH	SM	10^8	10^5
INH seul	1,0	-	330	0
	0,2	-	500	0
	0,1	-	4000	4
SM seule	-	20	40	0
	-	4	4000	4
	-	2	> 500 000	> 500
INH + SM	1,0	20	0	0
	1,0	4	0	0
	1,0	2	> 1,6	0
	0,2	20	0	0
	0,2	4	0	0
	0,2	2	> 2,5	0
	0,1	20	0	0
	0,1	4	0	0
	0,1	2	>20	0

L 'acquisition d'une résistance bactérienne : mécanismes (2)

- mutations

Fréquence de mutants	Antibiotiques	Espèce bactérienne
10^{-5}	Streptomycine	<i>M. tuberculosis</i>
10^{-6}	Isoniazide	<i>M. tuberculosis</i>
	Céphalosporine III G	<i>Enterobacter cloacae</i>
		<i>P.s aeruginosa</i>
	Quinolones I	<i>E. coli</i>
10^{-7}	Imipénème	<i>Ps. aeruginosa</i>
	Quinolones II	<i>Ps. aeruginosa</i>
		<i>St. Aureus</i>
10^{-8}	Rifampicine	<i>St. Aureus</i>
		<i>M. tuberculosis</i>
10^{-10}	Céphalosporine III G	<i>E. coli</i>
	Quinolones II	

Plasmides chez les bactéries

- plasmides

- éléments mobiles transférables (conjugaison) :

- ADN circulaire indépendant du chromosome bactérien

- plusieurs résistances associées

- plusieurs copies de plasmides

- phénomènes épidémiques favorisés par la présence des antibiotiques

- présence de **transposons, d'intégrons**

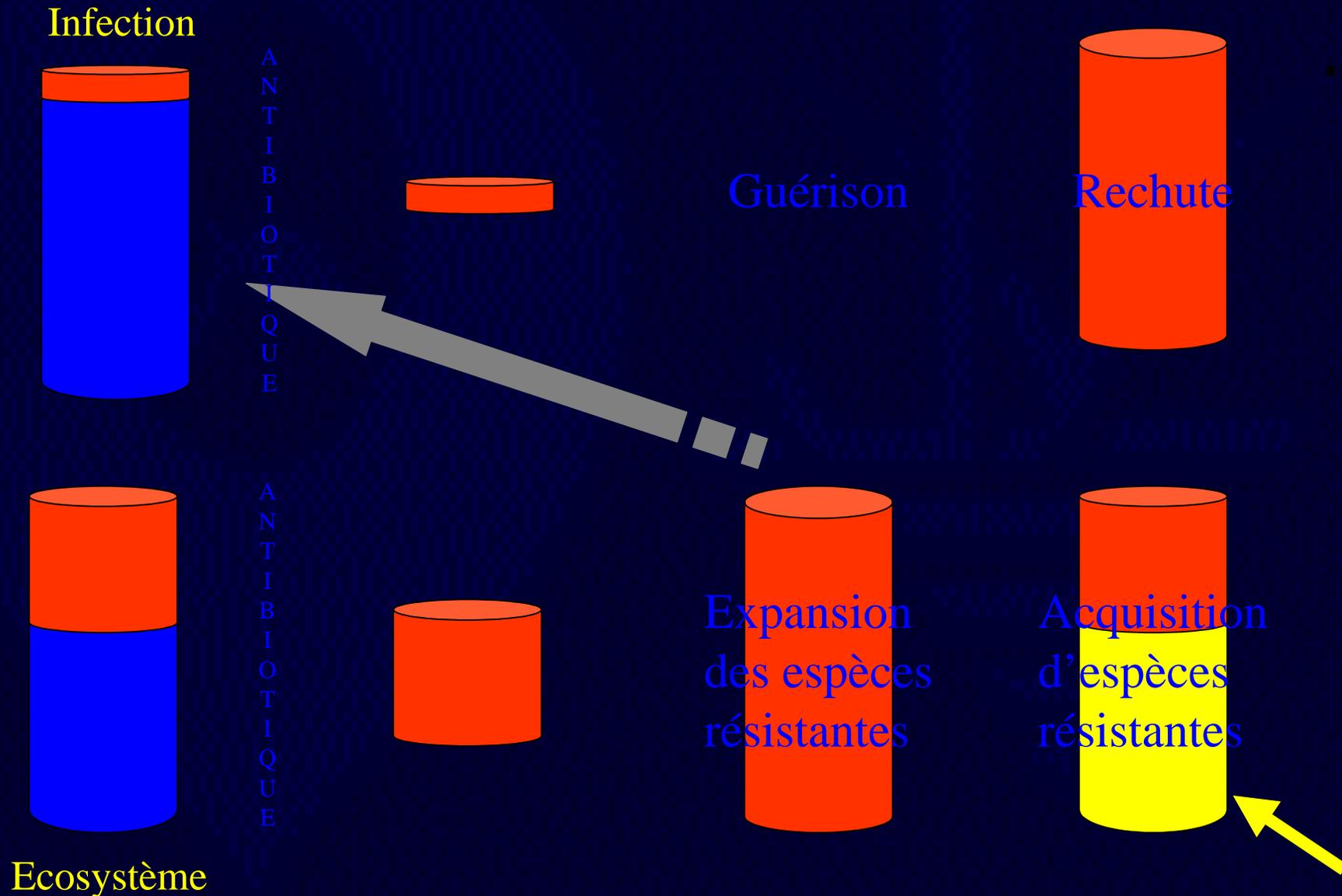
Transformation chez les bactéries

Exemple du pneumocoque

intégration de fragment de DNA
dans régions homologues

Acquisition et circulation de bactéries résistantes

Sélection ou émergence de bactéries résistantes ?



Les lieux où se font les sélections de bactéries résistantes et leur circulation

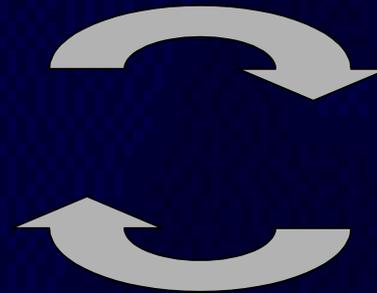


Hôpital

SAMR
BLSE
et les autres...

Ville

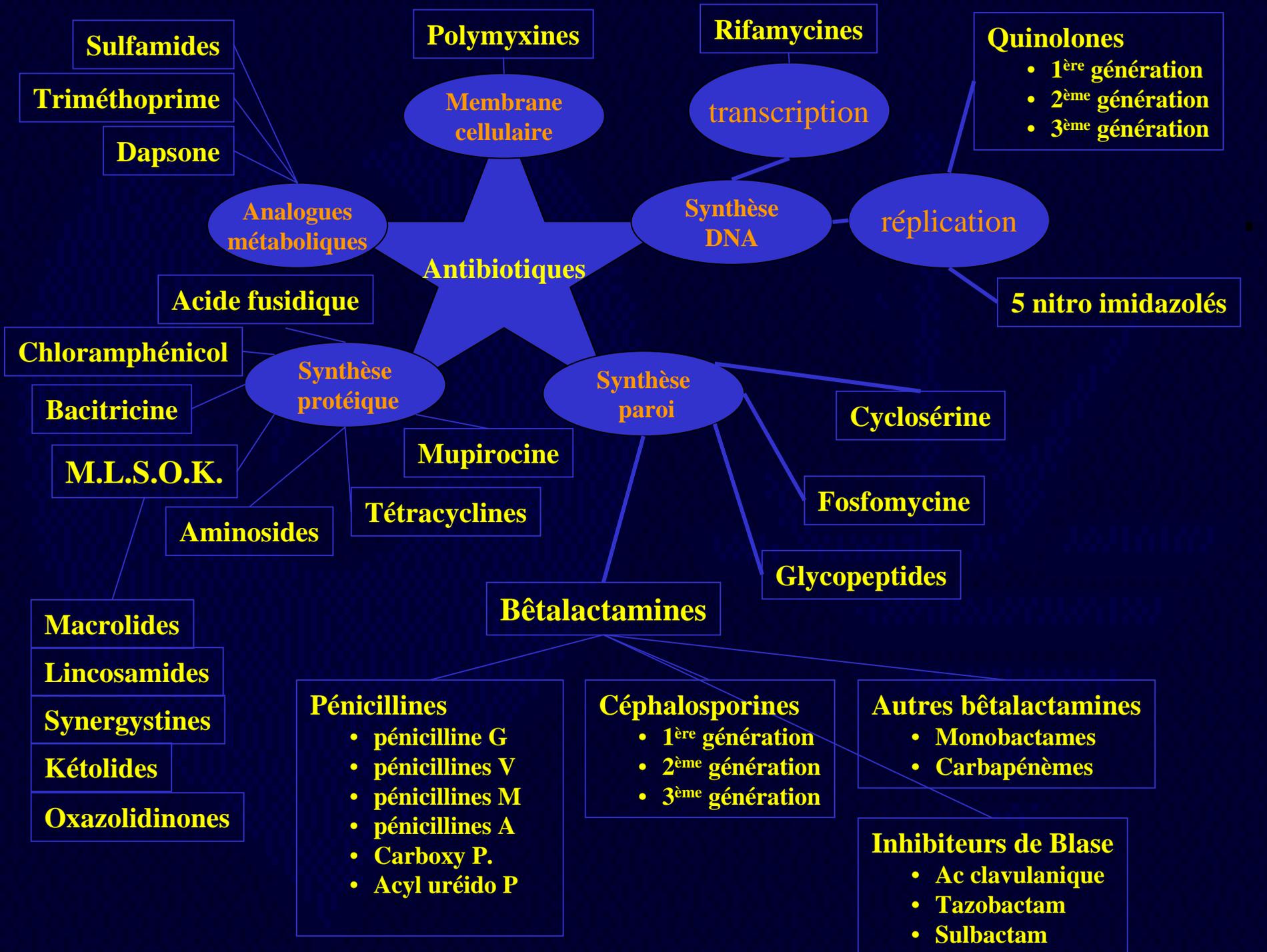
Pneumocoques
Haemophilus
E. coli



Industrie agro-alimentaire

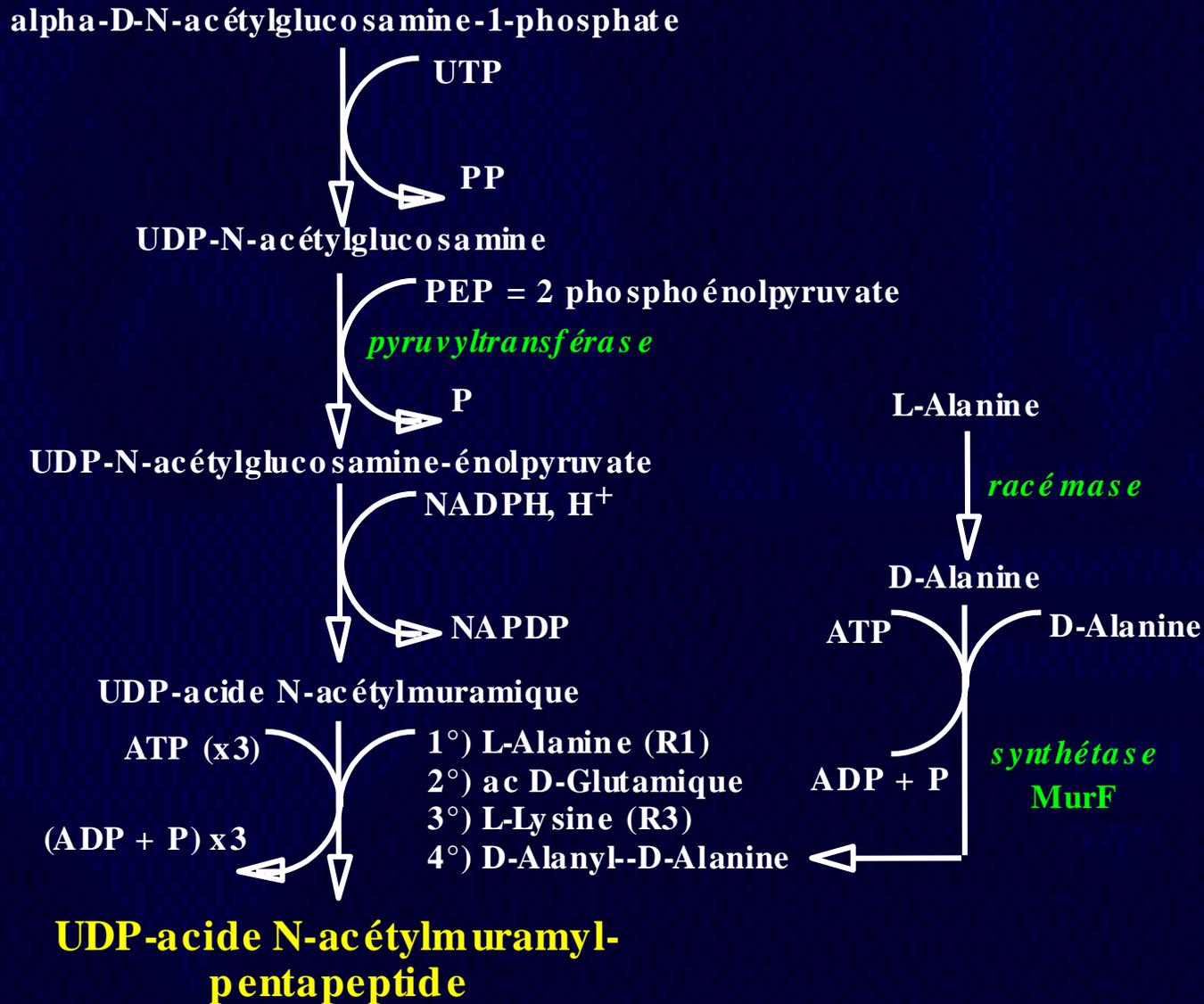
Enterocoques
E. coli

Mécanismes d'action des antibiotiques et résistance

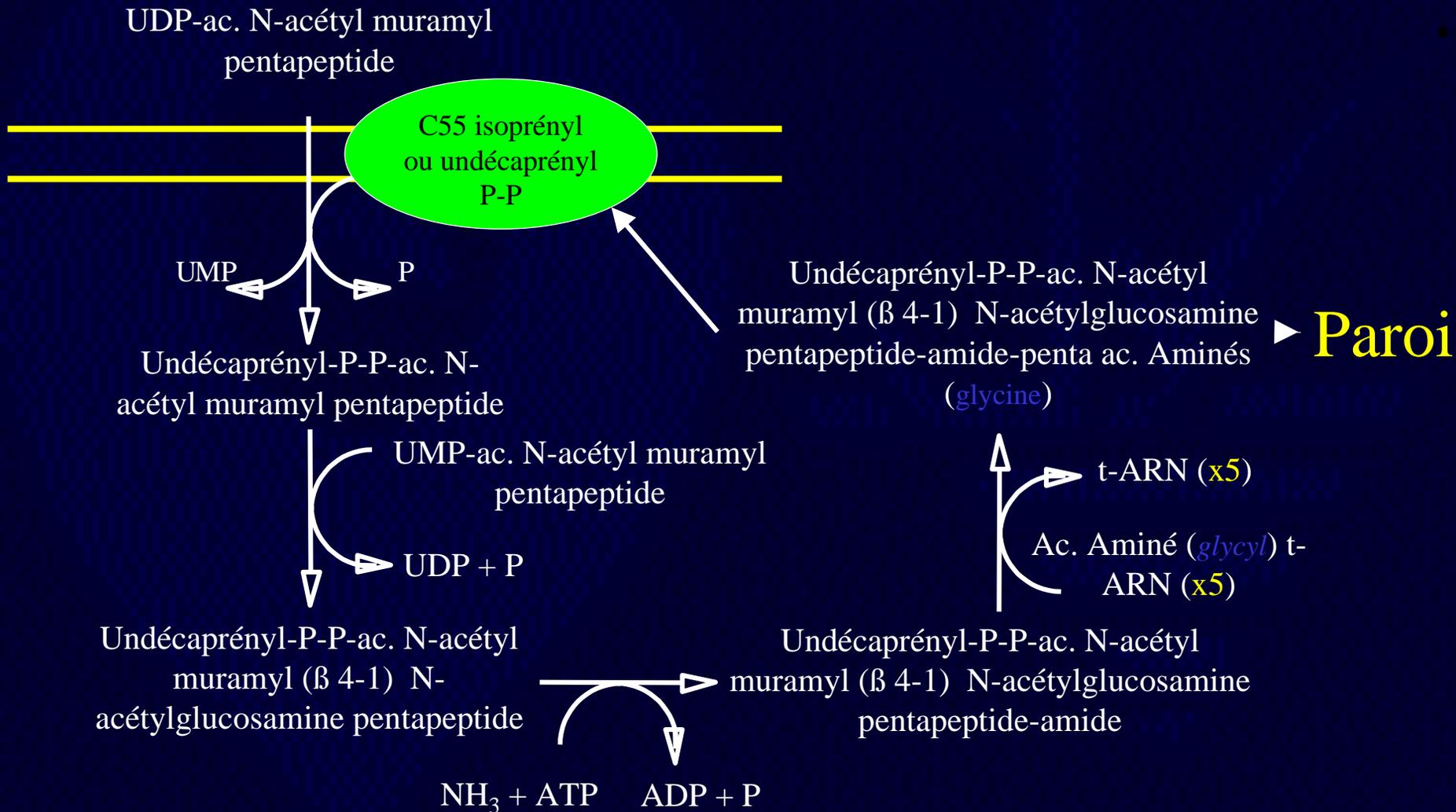


Antibiotiques actif sur la
biosynthèse de la paroi

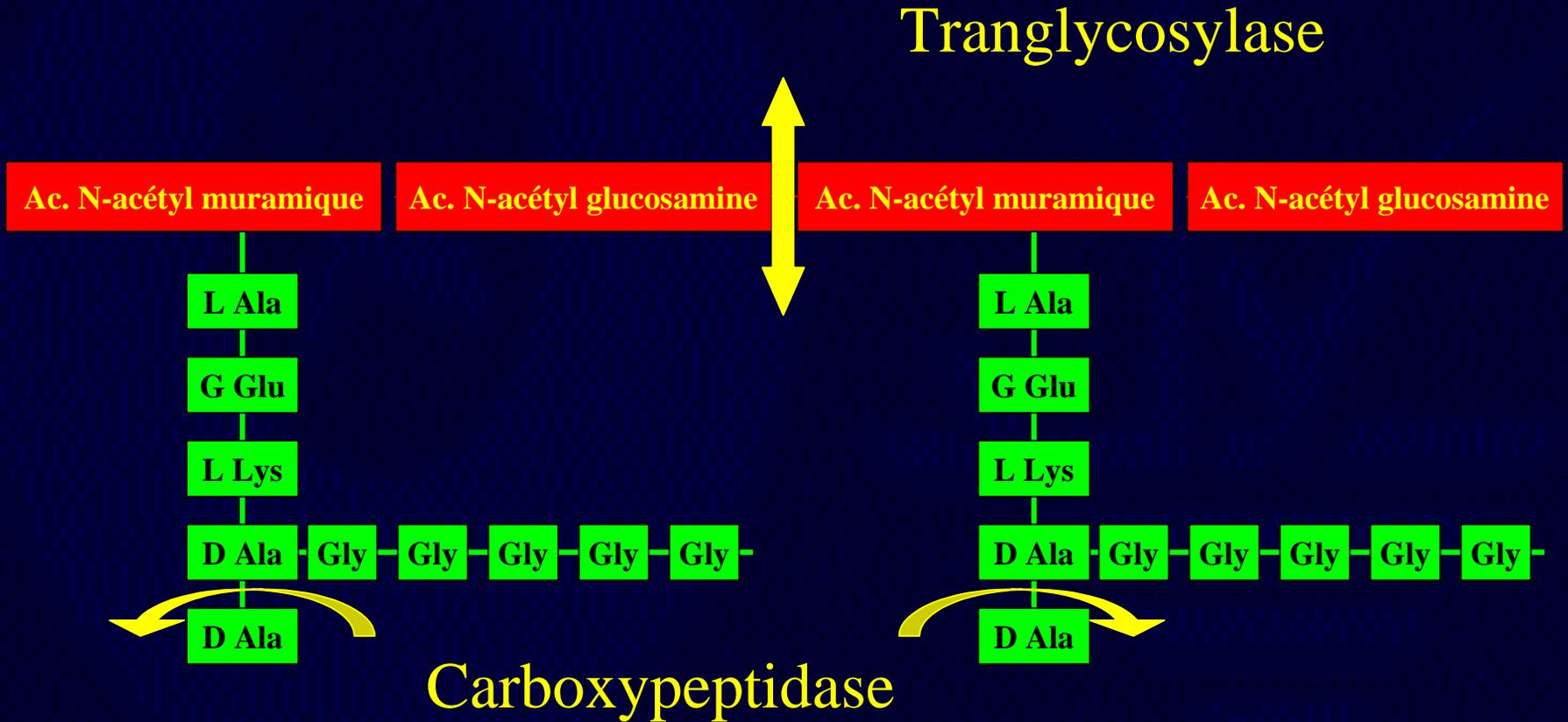
BIOSYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE (étape cytoplasmique)



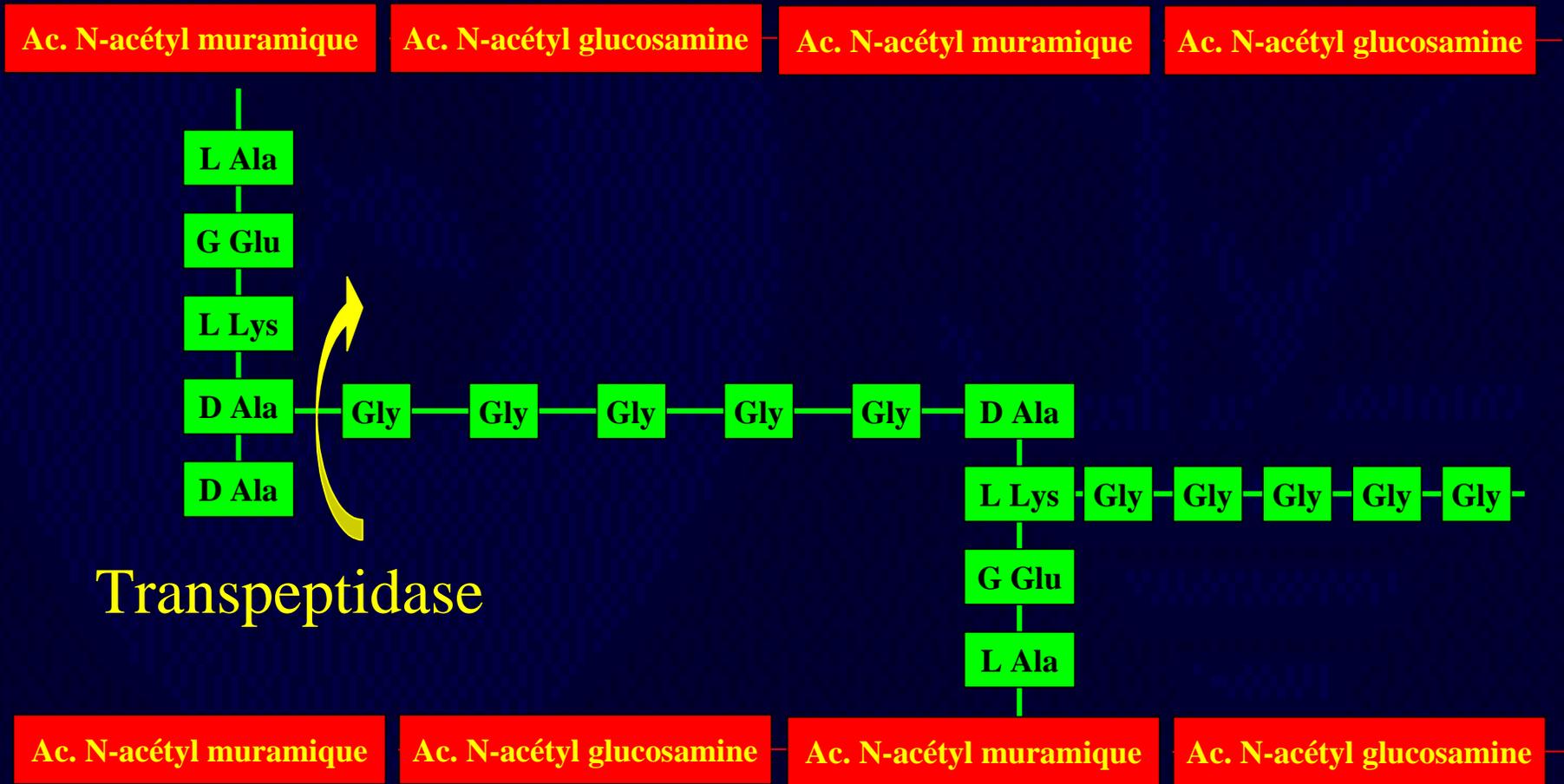
BIOSYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE (étape membranaire)



BIOSYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE (étape pariétale : réticulation)



BIOSYNTHESE DE LA PAROI BACTERIENNE (étape pariétale : réticulation)



Bêta-lactamines

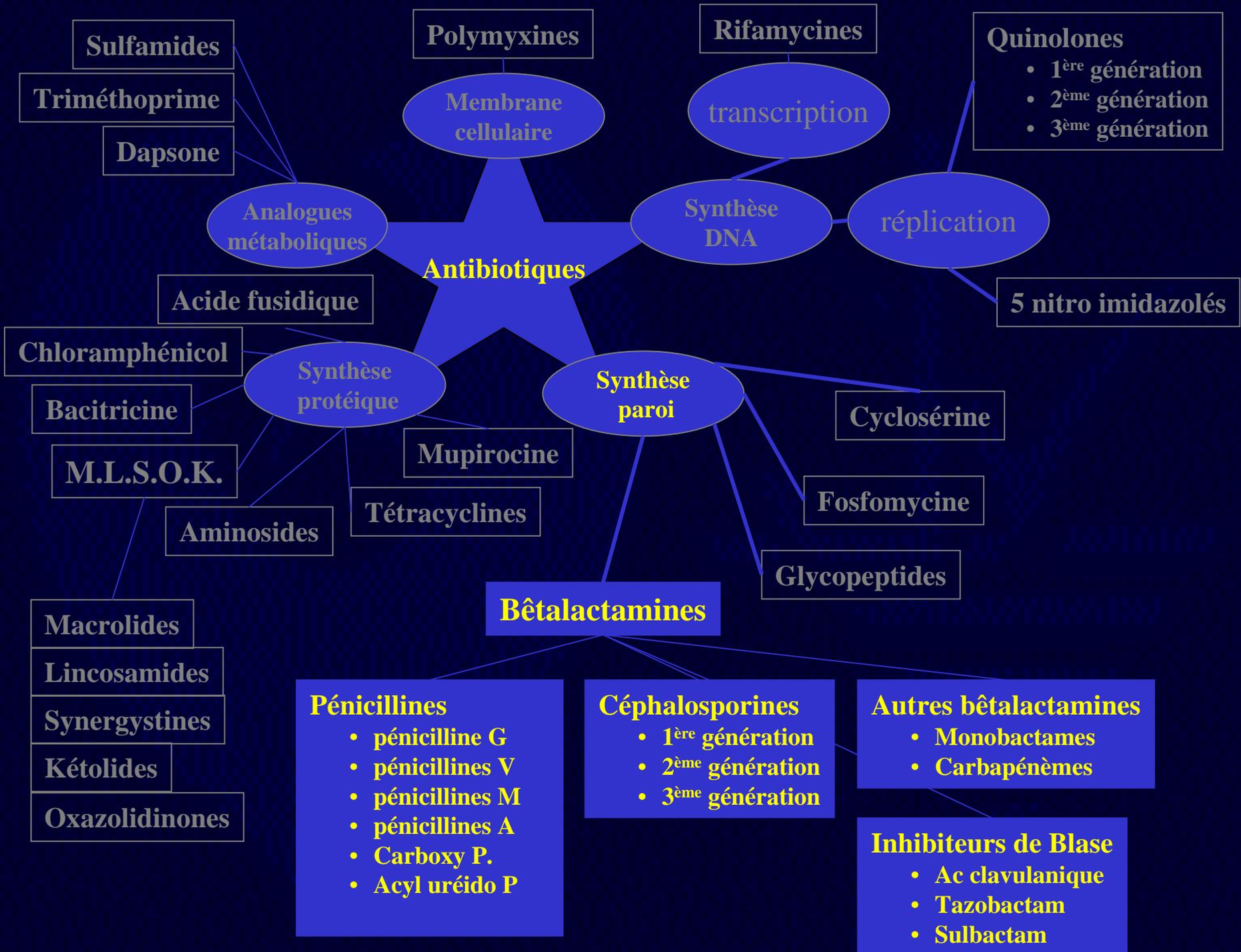
Les bêta-lactamines sont des antibiotiques qui agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne.

Elles sont classées en fonction de leur structure chimique.

Les principales classes sont :

- pénicillines

- céphalosporines



Bêta-lactamines : mode d'action (1)

Les bêta-lactamines se fixent sur des protéines :

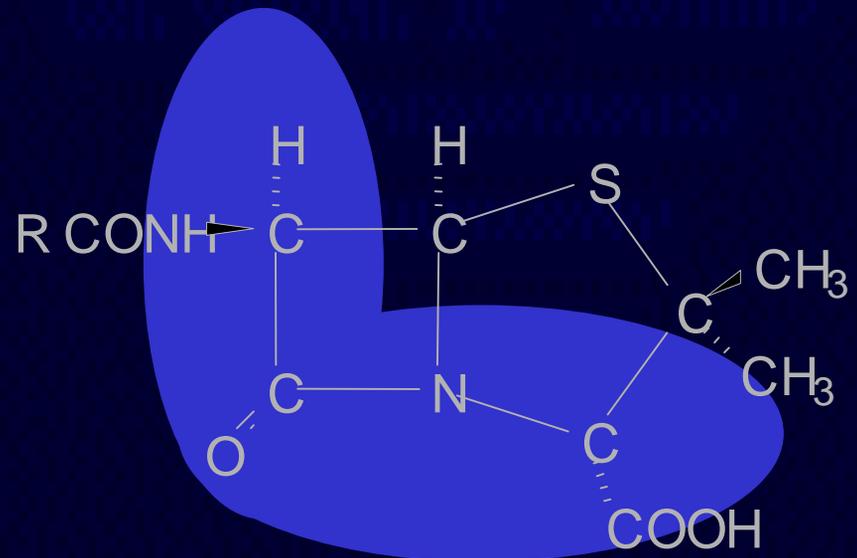
PLP ou PBP

Les PLP sont en fait les enzymes qui assurent la réticulation du peptidoglycane :

transglycosylases

transpeptidases

carboxypeptidases



Sérine peptidases réagissant avec les bêta-lactamines

Bêtalactamases

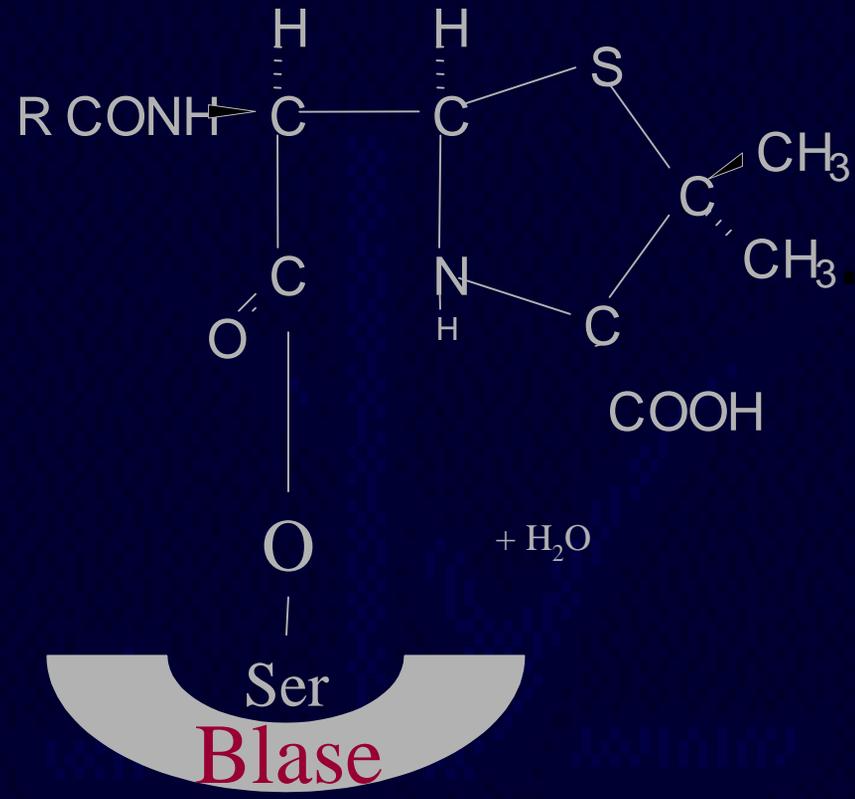
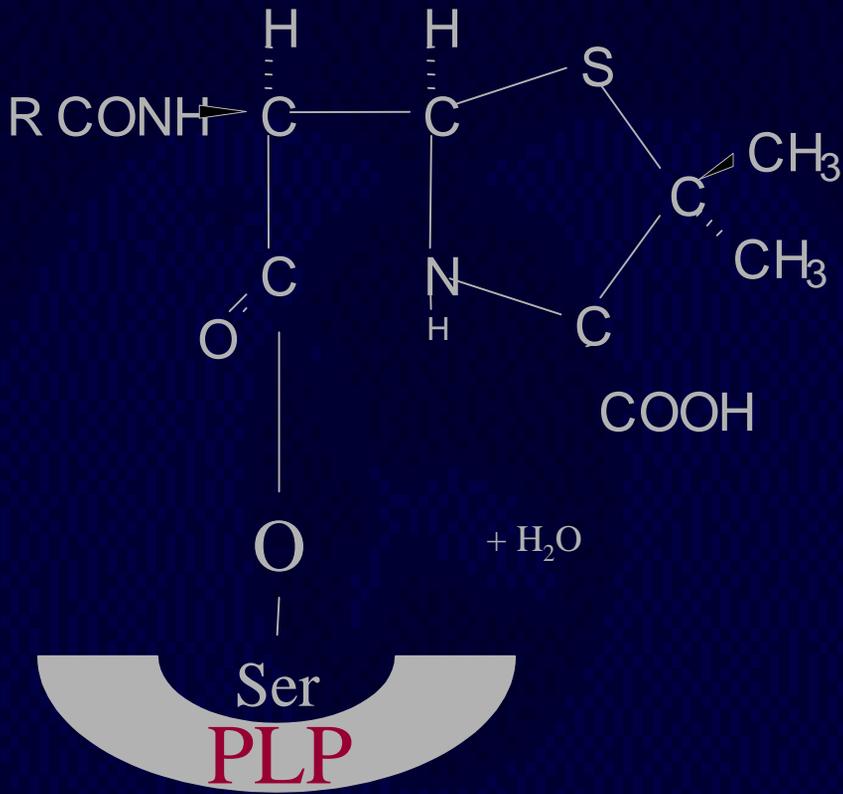
D-D carboxypeptidases

Bas poids moléculaire

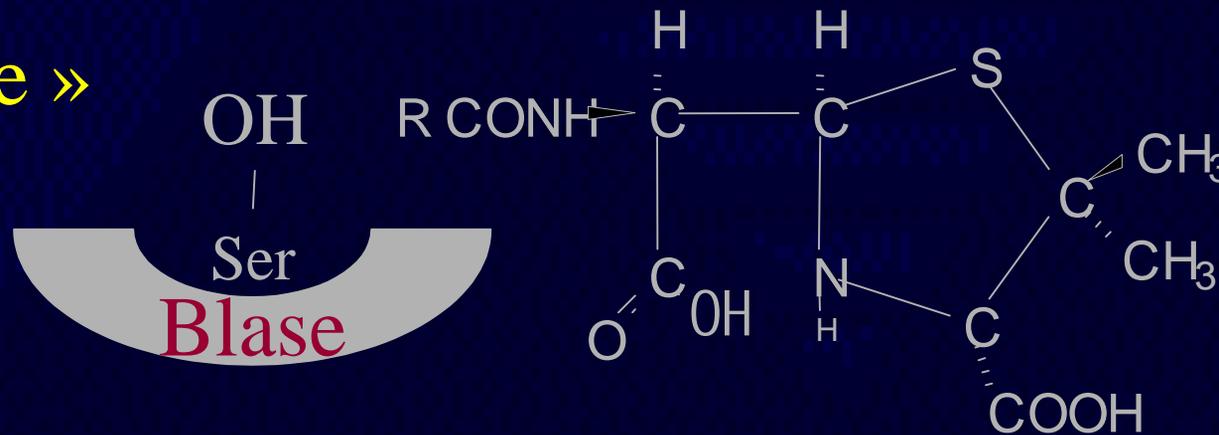
P.L.P.

Transpeptidases / Transglycosylases

Haut poids moléculaire



Complexe « stable »



PLP

Bêtalactamases

PLP

chaque espèce bactérienne possède plusieurs PLP

3 à 8 PBP (seules 2 à 4 sont essentielles)

numérotées

caractérisées par électrophorèse

Bêta-lactamases

Différents type

profil de substrat

activité enzymatique (K_m , V_m)

pH_i

Staphylococcus aureus

Bêtalactamase

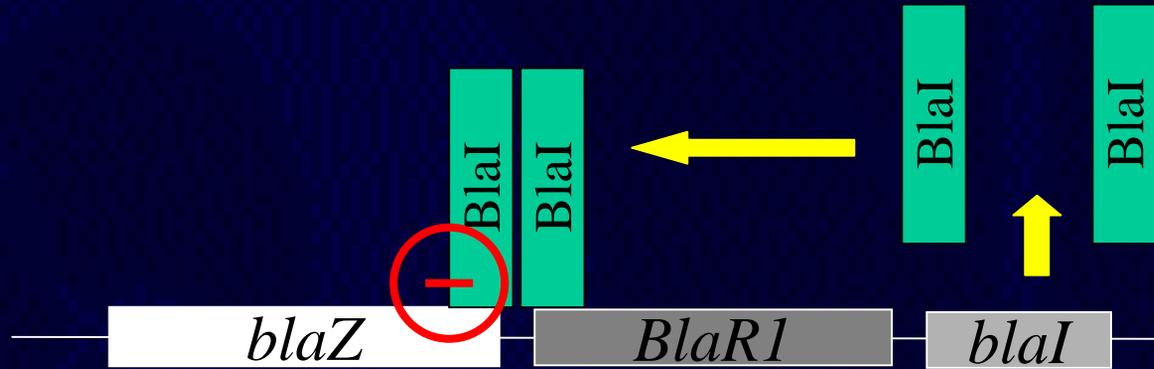
Nouvelle cible : Méti R

Staphylococcus aureus

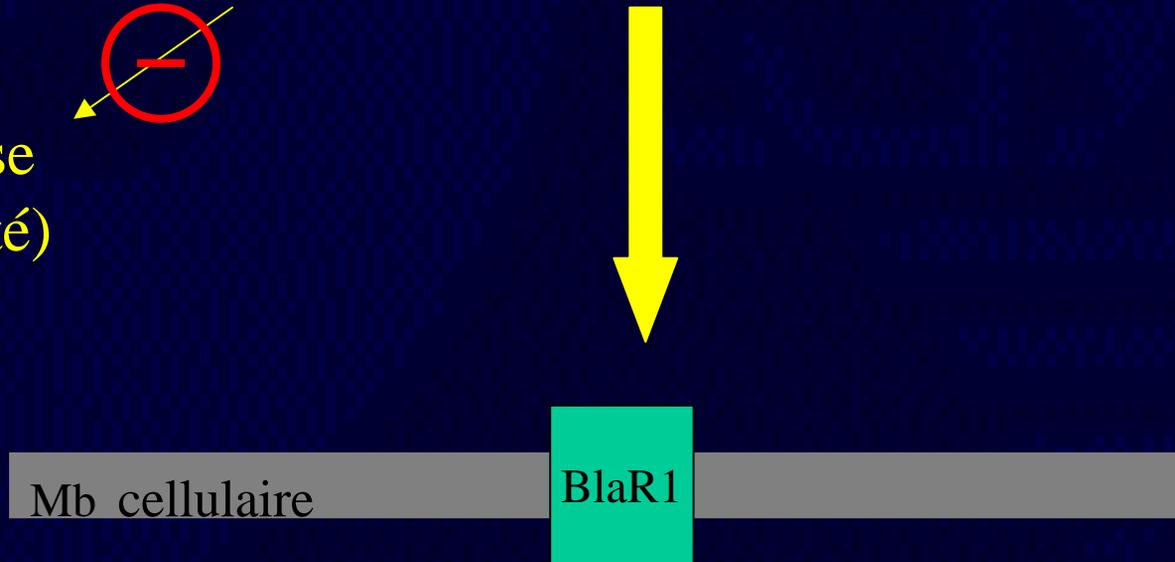
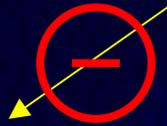
- **Sensibilité naturelle** vis-à-vis des bêta-lactamines
 - sensibilité diminue de Pénic. G vers C_{III}G
- **Résistance acquise** :
 - plasmides codant pour bêta-lactamases
 - acquisition d'un gène codant pour une PBP supplémentaire :
 - gène *mec A*
 - protéine PBP_{2a} ou PBP_{2'}
 - **R croisée à toutes les bêta-lactamines**
 - **Expression modulable**

Enzyme

Staphylococcus aureus

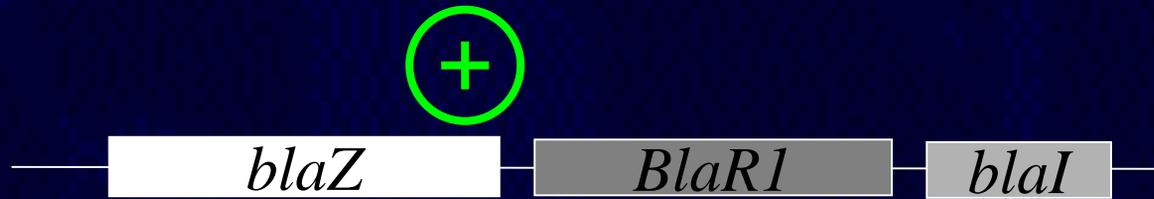


Bêta-lactamase
(faible diversité)

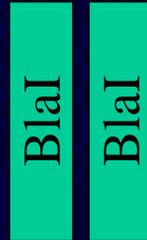
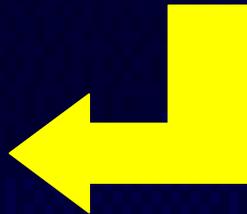


Enzyme

Staphylococcus aureus



Bêta-lactamase



Enzyme

Staphylococcus aureus

Conséquences pratiques :

Hydrolyse des bêtalactamines : Péni G, Péni A, Carboxy et Acyl Uréido P

Restauration de l'activité par IBL

ATTENTION : possibilité d'hyper production : BORSA l'oxacilline=> impact sur CMI à

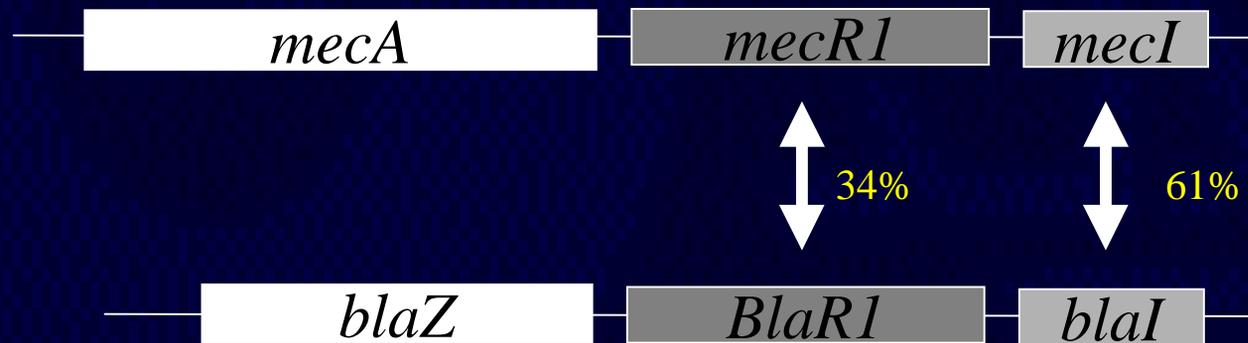
Cible

Staphylococcus aureus (2)

PLP_{2a}
PLP₂'



Délétion ou
mutation de *mecI* :
R homogène

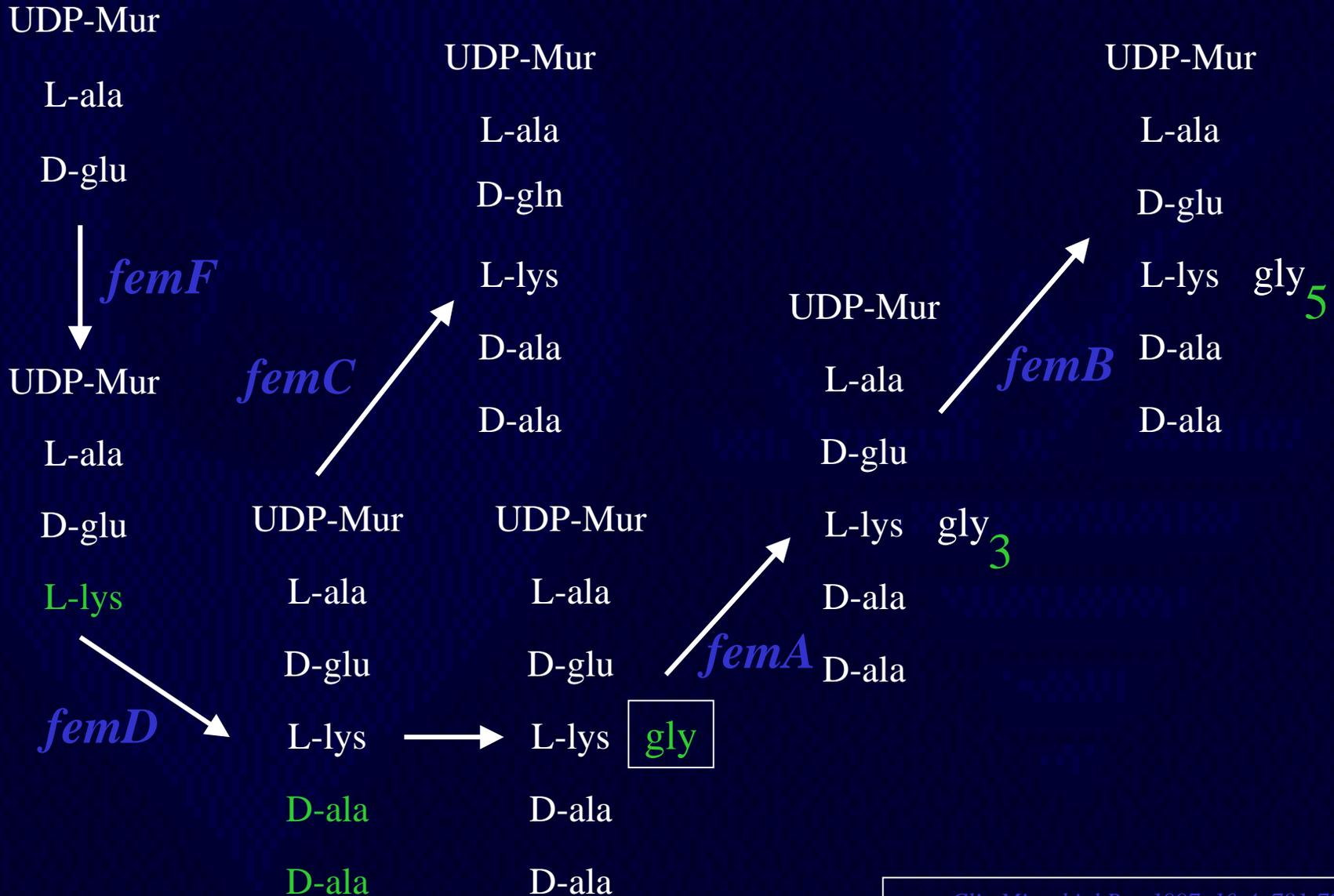


Grande variation de l'expression

in vitro usage d'artifices

Cible

Inactivation des gènes en particulier *femA* et *femB* engendre une augmentation de la sensibilité



Cible

Staphylococcus aureus

Conséquences pratiques :

Résistance croisée à toutes les bêta-lactamines P

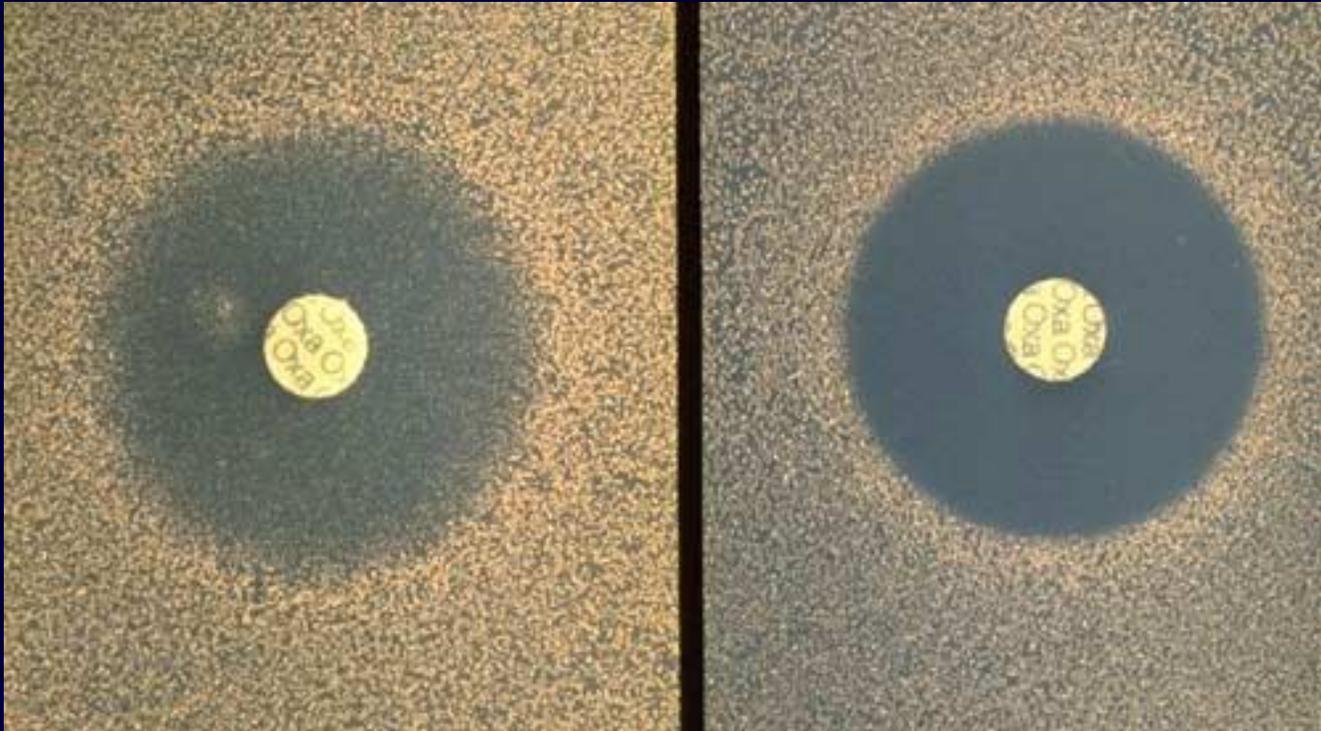
Expression variable de la résistance (*difficile*)

Résistances croisées fréquentes

SARM ou SAMR

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (oxacilline)

disque d'oxacilline à 5 microgrammes



30°C

37°C

Mais aussi méthodes génotypiques : recherche du gène ou de son produit

Streptococcus pneumoniae

et autres streptocoques « non groupables »

Modification de la cible

Streptococcus pneumoniae

- Présence de 6 PBP : 1_a, 1_b, 2_a, 2_x, 2_b, 3
- Sensibilité naturelle aux bêta-lactamines
- Acquisition de résistance (sensibilité diminuée) :
PSDP
 - Modification des gènes synthétisant les PBP par transformation.
 - Recombinaison de l'ADN avec espèces proches (« gènes mosaïques »)
 - Possibilité aussi de mutations ponctuelles

Modification de sensibilité variable selon degré de variation du gène natif => CMI

Enterococcus

Cible

Enterococcus

- **Présence d'une PBP₅** : faible affinité naturelle des bêta-lactamines
 - amoxicilline, pipéracilline (la plus grande affinité)
- **Résistance acquise** :
 - hyper production de PBP₅
 - cas d'*Enterococcus hirae* : plasmide (multi R) avec possibilité de biosynthèse d'une PBP pour laquelle les bêta-lactamines ont une très faible affinité.

Enterobactéries

PRINCIPALEMENT : ENZYMES

accessoirement : diminution de
perméabilité

Entérobactéries

- Sensibilité naturelle :

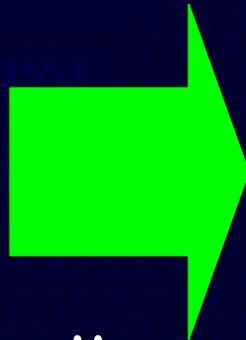
- **R naturelle** Péni G (et dérivés) et Péni M

- Péni A active sur *E coli*, *Proteus mirabilis*,
Shigella et *Salmonella*

- et aussi carboxy P, acyluréido P, CIG, CIIG, CIIIG,
monobactames, carbapénèmes

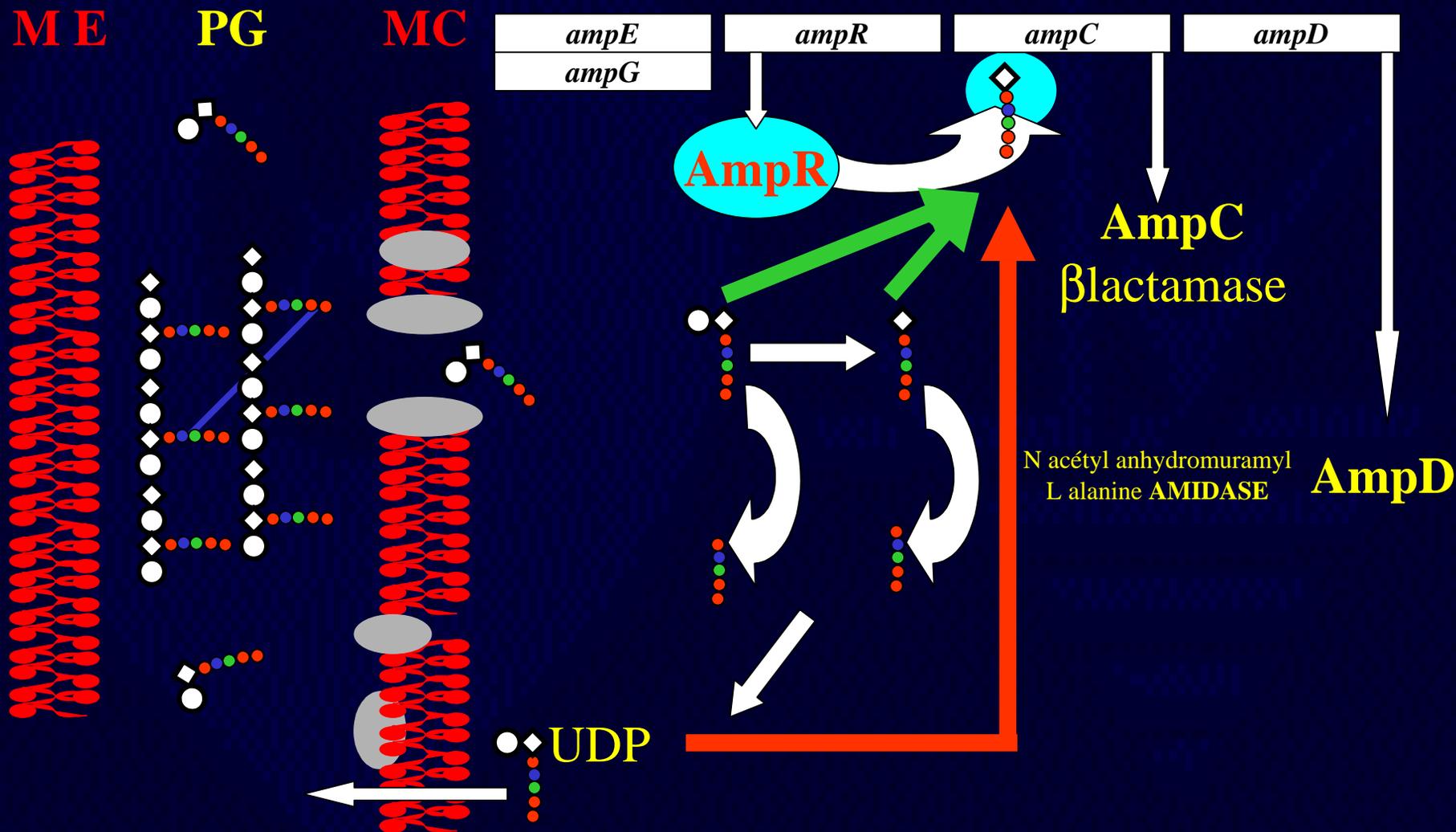
- Carboxy et acyl uréido P activent sur
Enterobacter, Serratia, Providencia, Citrobacter
freundii...

- Restent *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koserii* :
activité des classes précédentes si usage d 'IBL



CEPHALOSPORINASE CHROMOSOMIQUE

modèle de régulation (DIETZ H. *et al.* A.A.C.: (1997), 41-10, 2113-20) modifié



Céphalosporinases

Conséquences pratiques 1 :

Lorsque produites « normalement »

hydrolysent bien : péni A, C_IG et plus ou moins CIIG

hydrolysent très peu : Carboxy et Acyl uréido P, C_{III}G, C_{IV}G, Carbapénèmes, Monobactames

ne sont pas ou très peu inhibées par les IBL.

Céphalosporinases

Conséquences pratiques 2 :

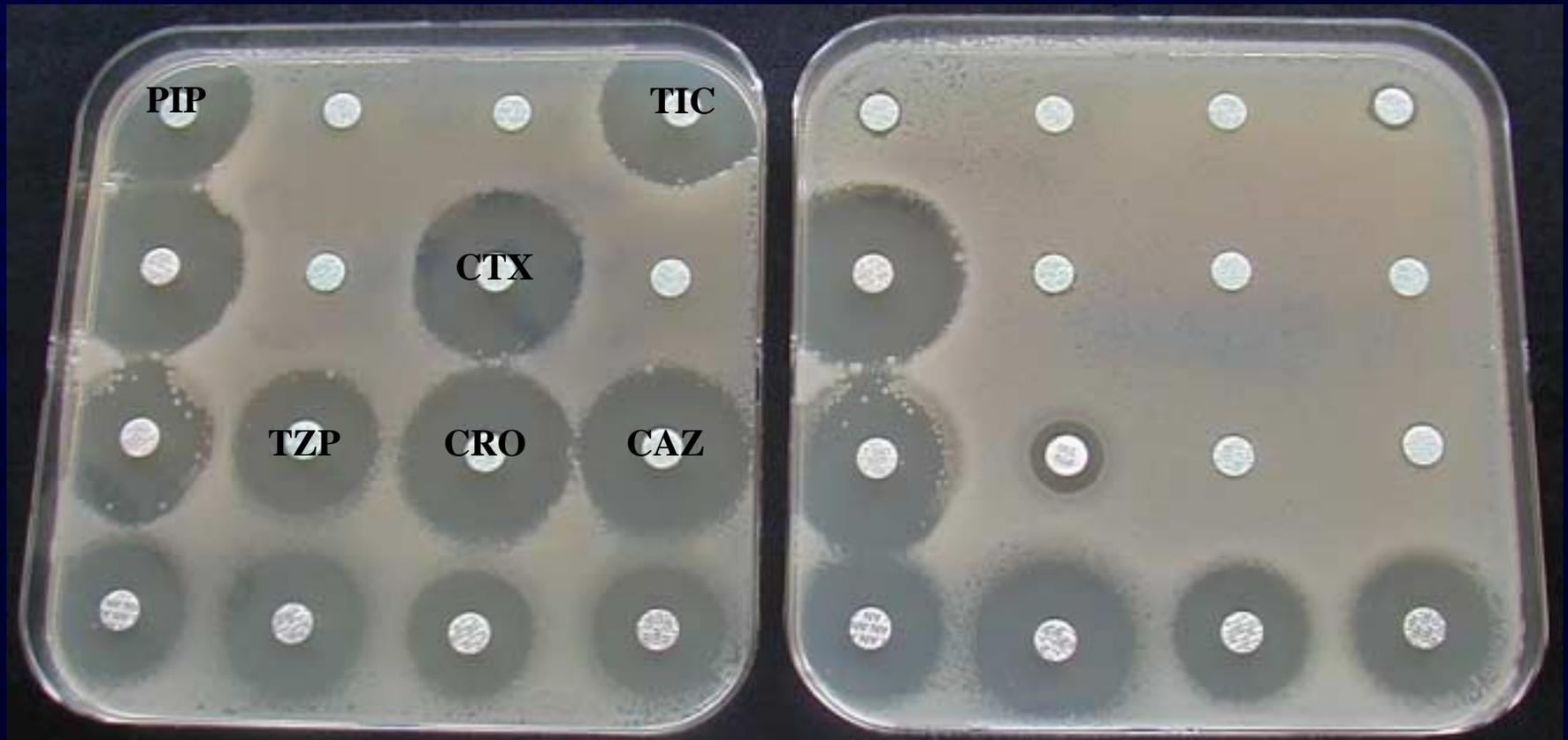
Lorsque hyper produites (RESISTANCE ACQUISE) :

hydrolysent bien : péni A, Carboxy et Acyl
uréido P, C_IG, C_{II}G, C_{III}G, Monobactames

hydrolysent un peu moins: C_{IV}G,

hydrolysent très peu : Carbapénèmes.

E. cloacae : mutant Case déréprimés



Entérobactéries

- **Résistance acquise** :
 - mutations au niveau des gènes de régulation de production des bêtalactamases naturelles (céphalosporinases (vu avant))
 - acquisition de plasmides codant pour des bêta-lactamases
 - grande diversité de gènes (TEM, SHV, PSE, OXA)
 - » portés par plasmides (exception (*Klebsiella* : *Len*))
 - » copies multiples
 - » sans régulation
 - » possibilité de mutants

Principalement des pénicillinases : inhibées par les IBL

Classification des bêta-lactamases

Functional and molecular characteristics of the major groups of beta-lactamases.

Functional group	Major subgroups	Molecular class	Attributes of beta-lactamases in functional group	Estimated no. of enzymes	
				1995	2000
1		C	Often chromosomal enzymes in gram-negative bacteria but may be plasmid-encoded. Confer resistance to all classes of beta-lactams, except carbapenems (unless combined with porin changes). <u>Not inhibited by clavulanic acid.</u>	32	51
2		A,D	Most enzymes responsive to <u>inhibition by clavulanic acid</u> (unless otherwise noted).	136	256
	2a	A	Staphylococcal and enterococcal penicillinases included. Confer high resistance to penicillins.	20	23
	2b	A	Broad-spectrum beta-lactamases, including TEM-1 and SHY 1, primarily from gram-negative bacteria.	16	16
	2be	A	Extended-spectrum beta-lactamases conferring resistance to oxyimino-cephalosporins and monobactams.	36	119
	2br	A	Inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases; one inhibitor-resistant SHV-derived enzyme.	9	24
	2c	A	Carbenicillin-hydrolyzing enzymes.	15	19
	2d	D	Cloxacillin-(oxacillin)-hydrolyzing enzymes; modestly inhibited by clavulanic acid.	18	31
	2e	A	<u>Cephalosporinases</u> inhibited by clavulanic acid.	19	20
	2f	A	Carbapenem-hydrolyzing enzymes with active site serine. inhibited by clavulanic acid.	3	4
3	3a,3b, 3c	B	Metallo-beta-lactamases conferring resistance to carbapenems and all β -lactam classes except monobactams. Not inhibited by clavulanic acid.	13	24
4		?	Miscellaneous unsequenced enzymes that do not fit into other groups.	7	9

Table from Bush K, CID 2001;32 (1 April), [Table 1, p. 1086]

« Pénicillinases »

« Céphalosporinase »

Principales pénicillinases

Conséquences pratiques :

Leur expression dépend du nombre de copies

hydrolysent bien : péni A, Carboxy et Acyl
uréido P, un peu les C_IG

hydrolysent pas ou très peu : C_{II}G, C_{III}G, C_{IV}G,
Carbapénèmes, Monobactames

sont inhibées par les IBL.

Les pénicillinases subissent des mutations

Elargissement du spectre vers des bêta-lactamines normalement préservées :

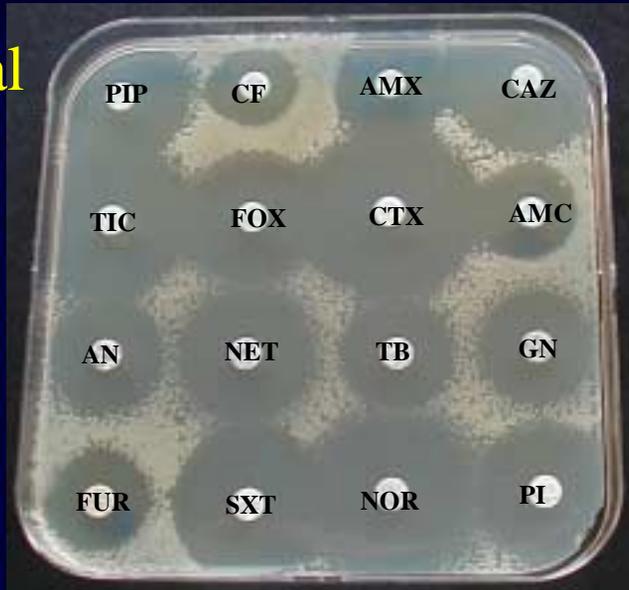
Bêta-lactamases à spectre étendu

Diminution de l'affinité globale des bêta-lactamines en particulier les IBL :

TRI

Différents niveaux de résistance de *E. coli*

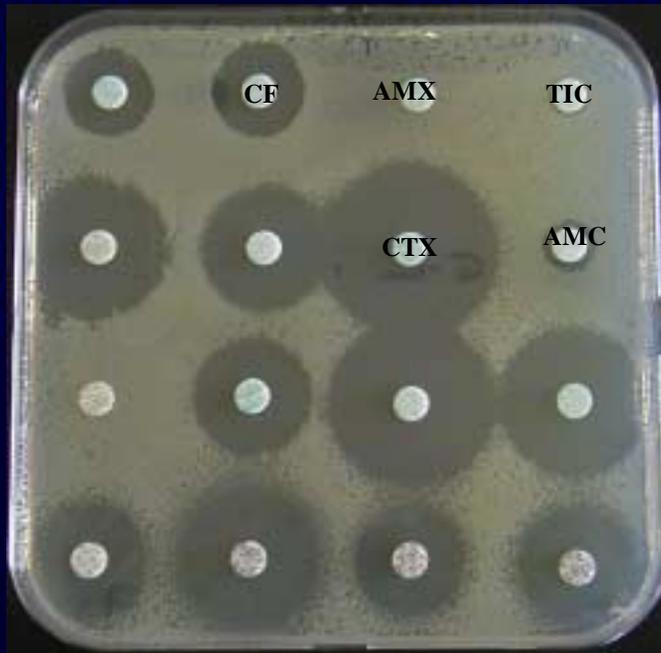
Normal



Pase



TRI



BLSE



A noter que les différents
mécanismes de résistance peuvent
être associés

ex :Céphalosporinase dérégulée associée à BLSE

Entérobactéries : cas de *E. coli*

- Le gène *AmpC* est présent mais :
 - promoteur déficient
 - présence d 'ADN (atténuateur) entre promoteur et gène de structure

- Toutefois des souches peuvent exprimer parfois à haut niveau cette céphalosporinase
 - acquisition d 'un promoteur d 'une autre espèce
 - mutation du promoteur déficeint qui devient actif
 - copie multiples du gène *AmpC*
 - et aussi plasmides multiples codant pour céphalosporinase

Bacilles à Gram négatif (entérobactéries) :

résumé de l'action des différentes bêta-lactamases

1

Principales classes de bêtalactamines	Sérine protéases			Métallo enzymes	
	Pénicillinases		céphalosporinases	Pénicillinases classe B	
	Pénicillinases "natives"	Pénicillinases mutées			
	BLSE	TRI	naturelles	hyper produites	
<i>Sans objet résistance naturelle des Gram négatif</i>					
Pénicillines					
Pénicilline G	HYDROLYSE	HYDROLYSE	HYDROLYSE (moyenne)	HYDROLYSE	HYDROLYSE
Pénicillines M	HYDROLYSE	HYDROLYSE	HYDROLYSE (moyenne)	PAS D'ACTION	HYDROLYSE
Pénicillines A	HYDROLYSE	HYDROLYSE	HYDROLYSE (moyenne)	PAS D'ACTION	HYDROLYSE
Carboxy pénicillines	HYDROLYSE (moyenne)	HYDROLYSE	HYDROLYSE (moyenne)	HYDROLYSE	HYDROLYSE
Acyl uréido pénicillines				HYDROLYSE	HYDROLYSE
Inhibiteurs de bêtalactamases					
acide clavulanique	INHIBEES	INHIBEES	NON inhibes	NON inhibes	NON inhibes
sulbactam	INHIBEES	INHIBEES	NON inhibes	NON inhibes	NON inhibes
tazobactam	INHIBEES	INHIBEES	NON inhibes	NON inhibes	NON inhibes
Monobactame					
aztreonam	PAS D'ACTION	HYDROLYSE	PAS D'ACTION	PAS D'ACTION	HYDROLYSE
Céphalosporines					
céphalo I	HYDROLYSE (moyenne)	HYDROLYSE	PAS D'ACTION	HYDROLYSE	HYDROLYSE
céphalo II	PAS D'ACTION	HYDROLYSE	PAS D'ACTION	HYDROLYSE (variable)	HYDROLYSE
céphalo III	PAS D'ACTION	HYDROLYSE	PAS D'ACTION	PAS D'ACTION	HYDROLYSE
Carbapénèmes					
carbapénèmes	PAS D'ACTION	PAS D'ACTION	PAS D'ACTION	PAS D'ACTION	HYDROLYSE

Entérobactéries et diminution de perméabilité

- Mutation au niveau des gènes codant pour les structures des porines (Omp) :
 - diminution de l'activité de nombreuses bêta-lactamines mais aussi : tétracyclines, chloramphénicol, quinolones...