

## II.3) Mécanismes de résistance et épidémiologie

### a) Définition de la résistance

La définition de l'antibiorésistance repose sur des données *in vitro*, en déterminant des CMI, ou concentrations minimales inhibitrices (la plus basse concentration entraînant une inhibition visible de la croissance bactérienne). Les définitions varient selon les continents et les comités d'expert : par exemple en Europe l'EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) et aux Etats Unis le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) anciennement NCCLS (National Committee for Clinical and Laboratory Standards). Trois catégories cliniques sont établies : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I). Les limites entre ces zones sont appelées valeurs critiques ou breakpoint. Elles sont déterminées par des comités d'expert annuellement. Ces valeurs se fondent aux Etats Unis sur les concentrations sériques atteignables chez le patient en respectant les doses classiques recommandées. En Europe, la marge de manœuvre est un peu plus large, on parle de concentration où la probabilité de réussite clinique est grande. La zone intermédiaire est une zone où l'issue clinique n'est pas prévisible *a priori*.

### b) Généralités et quelques exemples de résistance

L'antibiorésistance constitue un des défis médicaux majeurs du XXIe siècle. Ce phénomène serait responsable d'au moins 25 000 décès et 1.5 milliards d'euros de pertes par an en Europe. (Rapport sur l'encadrement des pratiques commerciales pouvant influencer la prescription des antibiotiques vétérinaires mai 2013)

([http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_CGAAER\\_mai\\_2013\\_Rapport\\_base\\_cle4abf34.pdf](http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_CGAAER_mai_2013_Rapport_base_cle4abf34.pdf))

A titre d'exemple, plus de 85 % des *S. aureus* sont résistants aux pénicillines par la production de bêta-lactamases inductibles. L'introduction de pénicilline stable à l'action des bêta-lactamases comme la méticilline a permis de contrecarrer ce problème de résistance jusqu'aux années 80, où des souches particulièrement résistantes, les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline), ont commencé à être un problème en Europe, aux Etats Unis et partout dans le monde, parce que non seulement elles étaient résistantes aux bêta-

lactamines mais aussi aux aminoglycosides, aux quinolones, aux macrolides, aux sulfamides etc ... Quelques antibiotiques sont encore actifs sur ces souches (glycopeptides, tigécycline, linézolide, ...) mais pour combien de temps encore ? En effet le génome des *S. aureus* contient une région particulière, entourant le gène *mecA* ; dans cette zone l'intégration de nouvelles séquences, et a fortiori de séquences permettant une multirésistance, est facile. De même, l'acquisition de plasmides est aisée dans cette espèce. Actuellement, on retrouve des SARM non seulement à l'hôpital responsables d'infections nosocomiales, mais aussi dans les lieux de collectivité, chez des patients qui n'ont jamais été hospitalisés (SARM communautaires) ou chez les animaux, et donc chez les éleveurs et les vétérinaires.

La tuberculose tue chaque année 1 400 000 personnes chaque année dans le monde. Les voyages, le vieillissement de la population, la mondialisation, le VIH contribuent à la réémergence de ce fléau dans les pays occidentaux sous des formes de plus en plus résistantes aux traitements actuels. On distingue les MDR (multidrug-resistant)-TB (résistantes à l'isoniazide et la rifampicine) apparues depuis 1993, les XDR (extensively drug-resistant)-TB (résistantes en plus aux principaux antibiotiques de seconde intention comme les fluoroquinolones). (Napier *et al.*, 2012) Bien que non encore officiellement reconnu par l'OMS, des auteurs rapportent des cas, en Inde, et en Chine de souches dites totalement résistantes au moins *in vitro*: les Mtb (Napier *et al.*, 2012) ou (totally drug-resistant) TDR-TB (Sotqiu *et al.*, 2013) ou (extremely drug resistant) XXDR (Farnia *et al.*, 2010).

Les premières observations de résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération en élevage en France ont été faites en 2006 (Meunier *et al.*, 2006), par la caractérisation des mêmes enzymes que celles connues chez l'homme (Madec *et al.*, 2008).

Chez l'homme, on note une résistance croissante de *Campylobacter* aux fluoroquinolones (65 % en 2008), d'*E.coli* (augmentation de 60 % entre 2008 et 2011) ou de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, de *Neisseria gonorrhoeae* à la ciprofloxacine (40 %). Le plus inquiétant est l'apparition de bactéries multirésistantes : souches d'*Acinetobacter baumannii* résistantes à l'imipénème (ABRI), responsables d'une létalité de 17 %, d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE) et surtout entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) résistantes à presque tous les antibiotiques, en augmentation constante depuis dix ans en Europe.

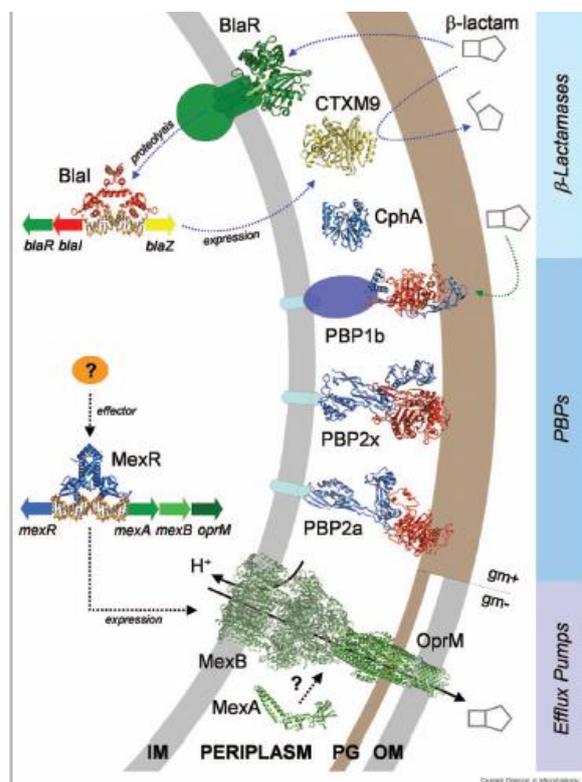
Les enjeux en médecine vétérinaire sont importants. Une grande part des antibiotiques produits dans le monde est aujourd'hui destinée aux animaux. Le marché français du médicament vétérinaire est le premier en Europe, et les antibiotiques constituent la classe thérapeutique la plus utilisée.

Depuis 1982, l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales est surveillée dans le cadre d'un réseau, RESABO devenu RESAPATH, qui depuis 2007 s'est étendu à l'ensemble des espèces animales (bovins, ovins, caprins, porcs, volailles, lapins, poissons, équins, chiens, chats...).

### c) Mécanisme de résistance aux bêta-lactamines

A l'heure actuelle, quatre grands mécanismes expliquent les phénomènes de résistances aux bêta-lactamines (**figure 18**) : une diminution de l'accessibilité pour l'antibiotique à ses cibles (efflux ou diminution de l'entrée des bêta-lactamines); une production d'enzymes dégradant les antibiotiques (bêta-lactamases); une diminution d'affinité des cibles (les PLP); enfin l'utilisation d'une autre voie métabolique que la voie de D,D-transpeptidation (PLP) pour réaliser la synthèse du peptidoglycane (L,D transpeptidation). Ces mécanismes peuvent être associés pour une souche bactérienne expliquant la multi-résistance.

Figure : 18 Mécanismes de résistance aux bêta-lactamines d'après (Wilke *et al.*, 2005)

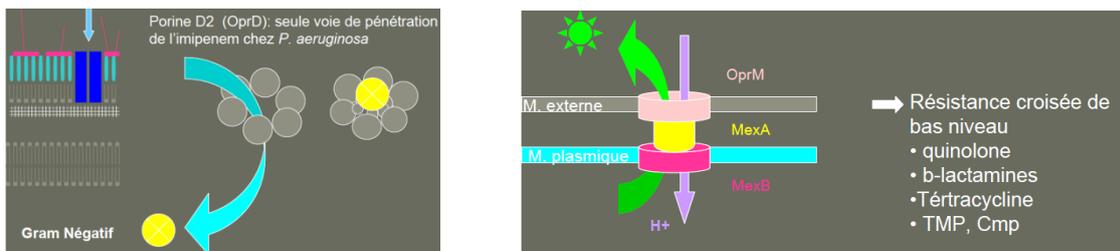


## Efflux et imperméabilité membranaire

Les bactéries à coloration de Gram négatif et les actinomycétales ont une paroi possédant une couche externe supplémentaire comparativement aux bactéries à Gram positif rendant impossible la pénétration de certaines pénicillines. On parle de résistance naturelle. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les béta-lactamines de la classe des carbapénèmes empruntent les porines D2, ensemble canalaire de protéines de la membrane externe. Certaines souches présentent des mutations au niveau de ces porines (ex OprD) et sont donc résistantes à cette classe de béta-lactamines.

L'équilibre physico-chimique, osmotique des bactéries implique l'intervention de protéines d'efflux. Ces pompes d'efflux (OprM MexA MexB) peuvent exporter certains antibiotiques. Les mutations de ces systèmes contribuent à la multirésistance.

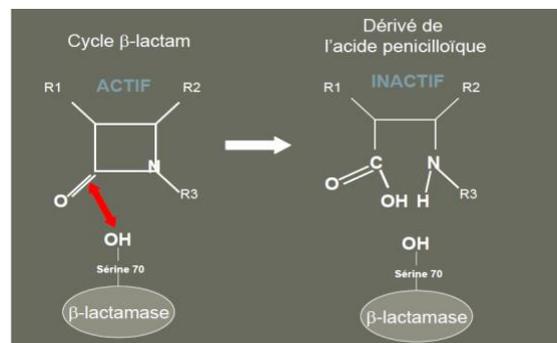
Figure 19: Efflux et imperméabilité membranaire d'après (Laurent, 2009)



## Béta-lactamases : classification et enjeux

(Hall *et al.*, 2005) De nombreuses espèces bactériennes, particulièrement des bacilles à Gram négatif produisent des enzymes capables d'ouvrir le cycle béta-lactame, rendant l'antibiotique inefficace. (**Figure 20**)

Figure 20 : Inactivation enzymatique d'après (Laurent, 2009)



En fonction des classes de bêta-lactamines affectées on parle de pénicillines, de céphalosporines, de BLSE ou bêta-lactamase à spectre étendu ou de carbapénèmes.

La classification structurale et fonctionnelle la plus utilisée est celle de Ambler datant des années 80 et revisitée récemment. On distingue 4 classes (A, B, C et D) (**figures 21 et 22**).

Figure 21 : Classification des bêta-lactamases (Ambler, modifié)

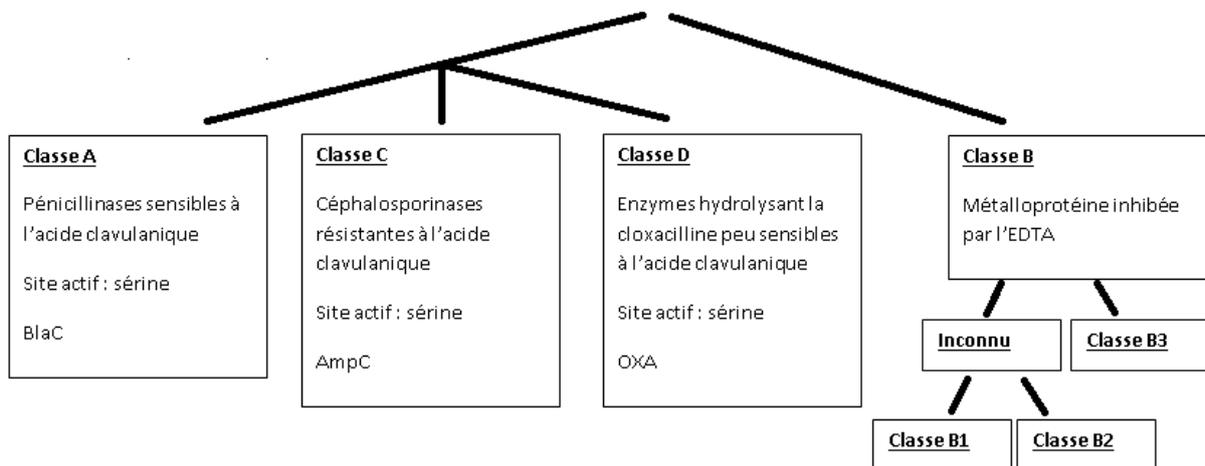


Figure 22 : Classification Ambler modifié des Beta-lactamases d'après Bush *et al.*, 2012

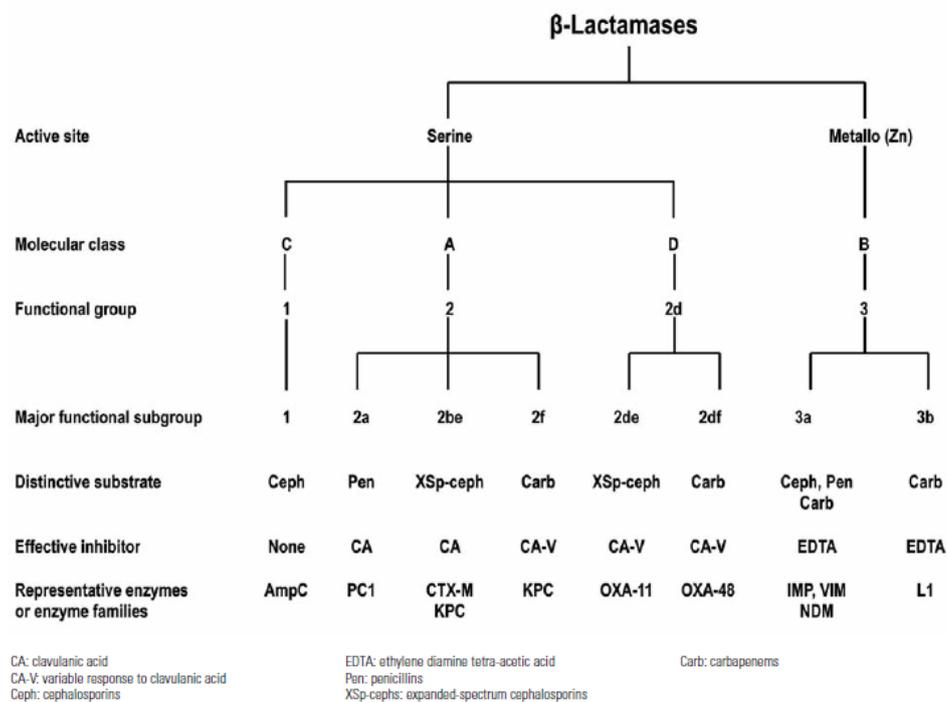
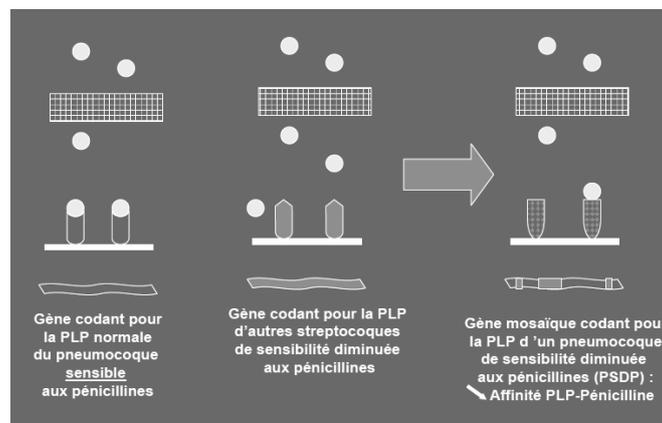


Fig. 2  
Correlation of β-lactamase structure and function

### PLP de faible affinité

Certaines bactéries ont développé un mécanisme de résistance impliquant l'acquisition de gènes codant pour une PLP supplémentaire, ayant une affinité pour les bêta-lactamines beaucoup plus faible que les PLP endogènes (ex PLP2a chez les staphylocoques responsable de la résistance à la méticilline), ou l'existence de mutations dans les gènes codant pour des PLP endogènes entraînant une affinité beaucoup plus faible pour les pénicillines (PLP5 de *Enterococcus faecium*).

Figure 23 : PLP de faible affinité et gènes mosaïques chez *Streptococcus pneumoniae* d'après (Laurent, 2009)



La résistance aux bêta-lactamines chez *S. aureus* est médiée, outre par des bêta-lactamases, et des PLP endogènes mutées de faible affinité, par une PLP acquise insensible aux bêta-lactamines: la PLP2a. (Hartman *et al.*, 1984; Utsui *et al.*, 1985). Celle-ci est le produit du gène *mecA* dont l'expression est dérégulée en présence de certaines  $\beta$ -lactamines ; PLP2a est une PLP de classe B qui continue à exercer son activité transpeptidase nécessaire pour la synthèse du peptidoglycane quand les quatre PLP endogènes sont inhibées par les bêta-lactamines. La réaction de la PLP2a avec les  $\beta$ -lactamines est très lente. (Graves-Woodward *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1999). La résistance conférée par PLP2a nécessite la coopération d'une trentaine de gènes auxiliaires appelés *fem* (factor essential for methicillin resistance) avec *mecA* (De Lencastre *et al.*, 1999).

Chez certaines bactéries, l'usage des  $\beta$ -lactamines a sélectionné des souches possédant des PLP endogènes de moindre affinité pour ces antibiotiques mais qui conservent leur activité physiologique.

Les gènes des PLP impliqués dans la résistance sont dits mosaïques (Spratt, 1988). Cette caractéristique résulte de recombinaisons génétiques intra- et inter-espèces de fragments d'ADN. C'est grâce à un phénomène de compétence naturelle que de l'ADN exogène peut être intégré efficacement dans le génome des souches réceptrices. Des mutations ponctuelles peuvent également être contractées.

Les PLP1 et PLP2 sont impliquées dans le phénomène de résistance de *N.gonorrhoeae*. Mais seul le gène *penA*, qui code pour PLP2, est mosaïque dans les souches résistantes de *N.gonorrhoeae* (Spratt *et al.*, 1988 et 1989).

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *S. pneumoniae* est due à des recombinaisons génétiques résultant en la production de PLP de faible affinité : la présence de  $\beta$ -lactamines entraîne la sélection de variants de PLP2x, PLP2b et PLP1a. On citera pour PLP2x, 3 mutations importantes décrites : T338A (perte d'un site de liaison d'une molécule d'eau et ainsi désorganisation des liaisons hydrogènes) M339F (modification stérique réduisant le taux d'acylation) et Q552 (introduction d'une charge négative, un glutamate). (Wilke *et al.*, 2005)

Bien évidemment une même souche peut présenter des modifications au niveau de plusieurs PLP. L'acquisition de forts niveaux de résistance aux céphalosporines chez *S. pneumoniae* requiert la modification de PLP1a outre celle de PLP2x (Smith *et al.*, 2003). Dans le cas de hauts niveaux de résistance aux pénicillines, il semblerait que l'acquisition des deux PLP1a et PLP2x d'affinité réduite soit nécessaire ainsi que la présence d'une PLP2b modifiée (Hakenbeck *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1998).

Les profils classiques de résistances aux bêta-lactamines sont résumés dans les **tableaux 10 et 11**.

La **figure 24** présente un aperçu de la richesse et de la répartition des PLP parmi le règne eubactérien.

Tableau 10 : Profils classiques de Résistances aux bêta-lactamines d'après urgentologie.fr

Abtique	PS	Pase	Hypercase	BLSE			Pénèmases			Efflux			D2
				OXA	PER		OprM	OprJ	OprN				
ticarcilline	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S		
ticar-AC	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S		
pipéracilline	S	R	R	R	R	S	S-	S	S	S	S		
piper-tazo	S	S	R	R	S	S	S-	S	S	S	S		
cefopérazone	S	R	R	R	R	R	S-	S	S	S	S		
ceftazidime	S	S	R	R	R	R	S-	S	S	S	S		
céfépime	S	S	SIR	R	R	R	S-	R	S	S	S		
cefpirome	S	S	SIR	R	R	R	S-	R	S	S	S		
aztréonam	S	S	R	R	R	S	S-	S	S	S	S		
imipénème	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R		

PS souche sauvage Pase Pénicillinase Hypercase Céphalosporinase hyperproduite BLSE Béta-lactamase à spectre étendu Pénèmase Carbapénèmase Efflux Pompe à efflux D2 Porine D2

Tableau 11 : Profil de résistance d'après (Caillon, 2013)

	Pénicillinase	Pase HN	Case	Case HN	BLSE
Amoxicilline	R	R	R	R	R
Amoxicilline + ac. clavulanique	S	I	R	I/R	I/R
Ticarcilline	R	R	S	R	R
Ticarcilline + ac. clavulanique	S	I	S	I/R	I/R
Pipéracilline	I	R	S	R	R
Pipéracilline + tazobactam	S	S/I	S	I/R	I/R
Céfotaxime, ceftriaxone, Cefprozil, Aztréonam	S	S	S	I/R	V
Céfépime	S	S	S	S	V
Imipénème	S	S	S	S	S

Pase HN Pénicillinase de Haut niveau Ccase Céphalosporinase Case HN Céphalosporinase de Haut niveau BLSE Béta-lactamase à spectre étendu

Figure 24: Répartition des PLP parmi le règne eu bactérien d'après (Sauvage *et al.*, 2008)

	Class A							Class B						Class C												
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B5	B6	B-lke-I	B-lke-II	B-lke-III	Type-4	Type-5		Type-7	Type-AmPH				
<b>Gram -</b>																										
<i>Escherichia coli</i> K12	PBP1a <i>ponA</i>	PBP1b <i>ponB</i>				PBP1c <i>pbpC</i>												PBP4 <i>dacB</i>	PBP5 <i>dacA</i>	PBP6 <i>dacC</i>	PBP6b <i>dacD</i>	PBP7 <i>pbpG</i>		PBP4b <i>yefw</i>	AmpH <i>ampH</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	PBP1 <i>ponA</i>											PBP2 <i>ftsI</i>						PBP3 <i>pbp3</i>				PBP4 <i>pbp4</i>				
<b>Gram +</b>																										
<i>Bacillus subtilis</i> 168		PBP1 <i>ponA</i>	PBP2c <i>pbpF</i>	PBP4 <i>pbpD</i>		PBP2d <i>pbpG</i>		PBP3 <i>pbpC</i>	SpoVD <i>spoVD</i>	PBP2b <i>pbpB</i>	PBP2a <i>pbpA</i>	PbpH <i>pbpH</i>	PBP4b <i>yyrR</i>				PBP4a <i>dacC</i>	DacF <i>dacF</i>	PBP5 <i>dacA</i>	PBP5* <i>dacB</i>				PBP4* <i>pbpE</i>	PbpX <i>pbpX</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA252		PBP2 <i>pbp2</i>						PBP2a <i>mecA</i>		PBP1 <i>pbpA</i>	PBP3 <i>pbp3</i>								PBP4 <i>pbp4</i>							
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b F236		PBP1 <i>lmo1892</i>	PBP4 <i>lmo2229</i>					PBP <i>lmo0441</i>		PBP2 <i>lmo2039</i>	PBP3 <i>lmo1438</i>								PBP5 <i>lmo2754</i>					PBP <i>lmo0540</i>		
<i>Enterococcus faecalis</i> V583		PBP1a <i>EF_1148</i>	PBP2a <i>EF_0680</i>	PBP1b <i>EF_1740</i>				PBP4 <i>EF_2476</i>		PBP2 <i>EF_0891</i>	PBP2b <i>EF_2857</i>								DacF <i>EF_3128</i>					PBP <i>EF_0746</i>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6		PBP1a <i>pbpA</i>	PBP2a <i>pbp2&amp;</i>	PBP1b <i>pbp1b</i>						PBP2x <i>pvpX</i>	PBP2b <i>pbp2b</i>								PBP3 <i>pbp3</i>							
<b>Actinomycetes</b>																										
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)							3 PBP-A <i>sco3901</i> <i>sco2897</i> <i>sco5039</i>		PBP2 <i>sco2608</i>	PBP3 <i>sco2090</i>				4 PBP-B <i>sco3771</i> <i>sco3156</i> <i>sco4013</i> <i>sco3847</i>		3 PBP-B <i>sco3157</i> <i>sco3771</i> <i>sco3156</i>	PBP4 <i>sco3408</i>	PBP4 <i>sco6131</i>	PBP <i>sco4439</i>			PBP7 <i>sco3811</i>	PBP <i>sco4847</i> <i>sco7050</i>	PBP <i>sco0830</i>	PBP <i>sco7561</i>	PBP <i>sco2283</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv			PBP1 <i>ponA1</i>			PBP1A (r) <i>ponA2</i>		PBPA <i>pbpA</i>		PBP2 <i>pbpB</i>				PBP-lipo <i>Rv2864c</i>			PBP4 <i>Rv3627</i>		PBP5 <i>dacB1</i>			PBP7 <i>dacB2</i>		PBP <i>Rv0907</i>	PBP <i>Rv1367c</i>	
<b>Cyanobacteria</b>																										
<i>Anabaena species</i> PCC7120	PBP1 <i>air4579</i> <i>air5324</i> <i>air5326</i> <i>air2952</i> <i>air2981</i>	3-4-5-6				PBP2 <i>air5101</i>				PBP7 <i>air5045</i>	PBP8 <i>air0718</i>							PBP10 <i>air1666</i>	PBP11 <i>air0054</i>						PBP9 <i>air0153</i>	PBP12 <i>air2656</i>

### L,D transpeptidation

Chez les Mycobactéries, la présence de ponts interpeptidiques de type 3→3 était connue (Wietzerbin *et al.*, 1974) mais les enzymes responsables de leur formation n'étaient pas identifiées ainsi que la contribution de la voie de la L,D-transpeptidation dans la biosynthèse du peptidoglycane.

Chez *Enterococcus faecium* et *Mycobacterium tuberculosis*, la voie de L,D-transpeptidation a été décryptée. Par une approche de génétique inverse, la protéine impliquée a été caractérisée chez *E. faecium* (Mainardi *et al.*, 2005) (Lavollay *et al.*, 2009) Pour cet enzyme spécifique (**figure 26**), Ldtfm, le substrat de base n'est plus le pentapeptide mais un térapeptide ; chez *E. faecium* (souche mutante sélectionnée *in vitro* sur ampicilline), la liaison ne se fait plus entre le D Ala en 4<sup>ème</sup> position du donneur et le D Asn branché à la L-Lys en 3<sup>ème</sup> position de l'accepteur mais se fait entre la L Lys en 3<sup>ème</sup> position du donneur et le D-Asn branché à l'autre L Lys en 3<sup>ème</sup> position de l'accepteur (**Figure 25**). Ce processus implique deux enzymes : un première enzyme (une D,D carboxypeptidase) qui convertit le pentapeptide en térapeptide et un deuxième enzyme (une L,D transpeptidase) qui réalise le pont de type 3-3. Ces deux enzymes sont insensibles aux pénèmes, aux céphèmes et aux monobactames. A l'inverse, la L,D transpeptidase est inhibée par les carbapénèmes (**Figure 27**).

La contribution des L,D-transpeptidases a la formation des ponts interpeptidiques du peptidoglycane des formes stationnaires de *M. tuberculosis* est très importante (80%). La L,D-transpeptidation joue un rôle essentiel dans la survie des formes non répliquatives de *M. tuberculosis*. Les L,D-transpeptidases étant les seules enzymes capables de former de nouveaux ponts interpeptidiques en l'absence de synthèse de nouvelles sous-unités disaccharide-pentapeptides, il est possible que leur fonction soit d'assurer le maintien de la structure du peptidoglycane des bactéries en phase stationnaire.

L'implication de la L,D transpeptidation dans la résistance de haut niveau aux bêta-lactamines, est corrélée avec l'existence d'une carboxypeptidase insensible aux bêta-lactamines VanY ou DdcY chez *E. faecium*. A l'inverse, chez *C. jeikeium*, la carboxypeptidase impliquée, la PLP4, est très sensible aux bêta-lactamines, et la voie de L,D-

transpeptidation tend à disparaître (pont 3-3<1%) en présence de hautes concentrations d'ampicilline chez les souches mutantes hautement résistantes aux bêta-lactamines. (Lavollay, 2009)

Figure 25 : Voies de synthèse du peptidoglycane d'après (Lecoq *et al.*, 2012)

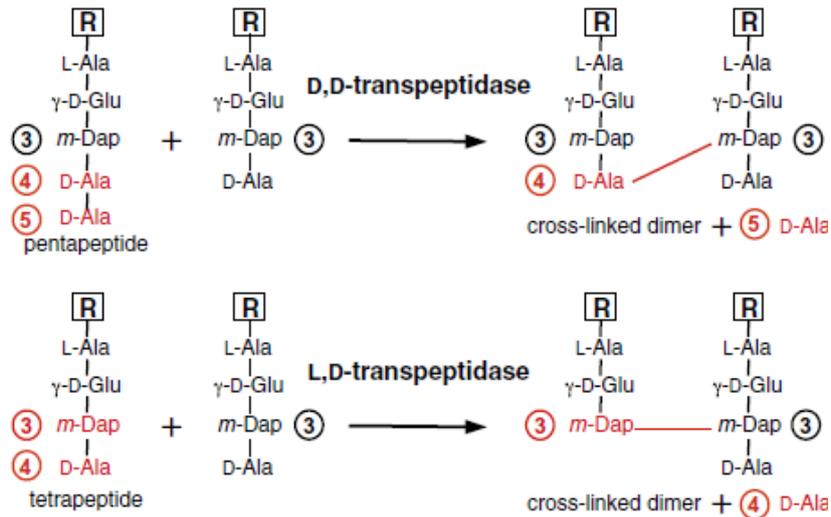


Figure 26 : Structure de la L,D transpeptidase de *E.faecium* d'après (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2006)

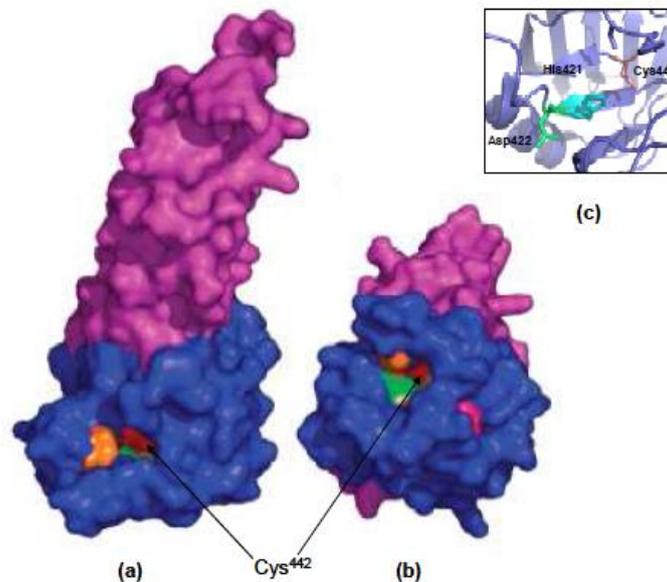
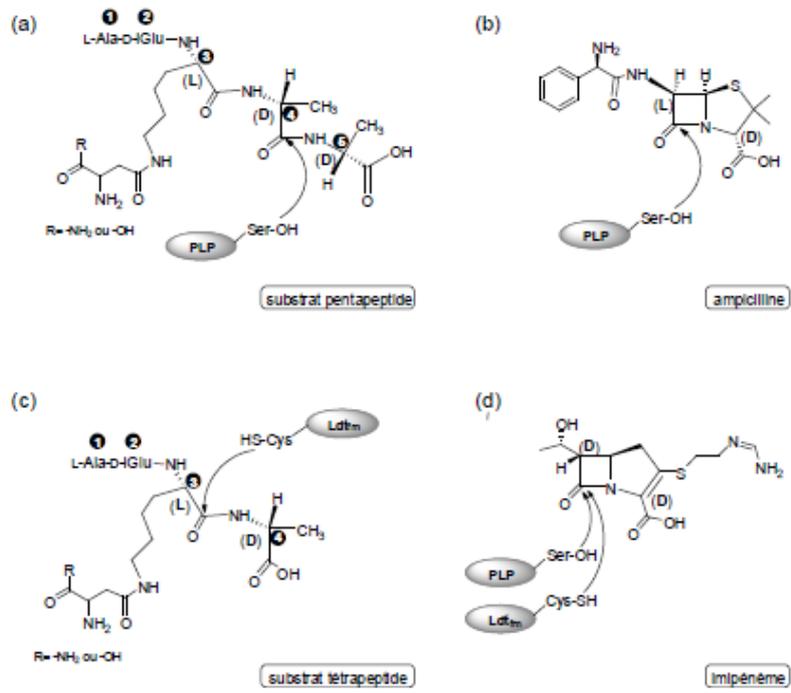


Figure 14. Structure de la L,D-transpeptidase de *E. faecium*. Le fragment de Ldt<sub>56</sub> cristallisé comprend un domaine N-terminal (magenta) et un domaine C-terminal (bleu) (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2006). Les vues latérale (a) et de dessous (b) montrent deux voies d'accès au résidu catalytique Cys<sup>442</sup> (en rouge). Les parois de la cavité catalytique sont constituées par les résidus His<sup>421</sup>, Asp<sup>422</sup>, Ser<sup>439</sup>, His<sup>440</sup> et le résidu Asn<sup>444</sup> (c).

Figure 27 : Mode d'action des transpeptidases et inhibition par les bêta-lactamines d'après (Lavollay, 2009)



*C'est ainsi que naissent les grandes inventions : par le contact inopiné de deux produits posés par hasard, l'un à côté de l'autre, sur une paillasse de laboratoire. Jean Echenoz*



<http://fr.slideshare.net/gueste52e15/antibiotic-history>