



Gilbert Greub¹, Adrian Egli², Jacques Schrenzel³

Antibiotiques, mécanismes de résistance, échanges génétiques et tests de résistances aux antibiotiques

Les antibiotiques sont largement utilisés depuis les années 40. Mais, progressivement, des résistances ont émergé rendant les tests de susceptibilité aux antibiotiques essentiels et soulignant l'importance des laboratoires de microbiologie clinique dans la prise en charge des infections. Cet article résume les modes d'action des principales classes d'antibiotiques, discute des mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et décrit les méthodes permettant de prédire la susceptibilité ou la résistance aux antibiotiques.

Rappel historique

Les agents antimicrobiens n'existaient pas jusqu'en 1909, lorsque des sels d'arsenic ont été utilisés pour le traitement de la syphilis. Ces sels, appelés «SAL-VARSAN», signifiant littéralement sauvé par l'arsenic, présentaient cependant une toxicité significative. Ainsi le premier antibiotique utilisé serait réellement la para-sulfamidochrysoïdine, un colorant de synthèse utilisé pour traiter les streptocoques dès 1935 et premier représentant de la famille des sulfamidés. Bien que la plupart des gens attribuent la découverte des antibiotiques à Fleming en 1929, la première utilisation en clinique remonte à 1935 pour les dérivés des sulfamidés et à 1939 pour la pénicilline, car ce n'est qu'à cette période que de la pénicilline a pu être purifiée par Florey et al. et que sa large utilisation à des fins thérapeutiques a véritablement débuté.

Les résistances aux antibiotiques étant préexistantes au développement des antibiotiques, la présence de pénicillinase a été décrite très rapidement, en 1940 déjà par Dune et ses collaborateurs. Depuis, l'utilisation des antibiotiques a révolutionné la prise en charge clinique. Et de nombreuses autres familles d'antibiotiques ont été décrites (tableau 1).

Objectifs de cet article

A travers cet article, les lecteurs pourront connaître les principales cibles sur lesquelles agissent les antibiotiques et comprendre les mécanismes conduisant au développement de résistances chez les bactéries. Ce thème est essentiel puisque la résistance aux antibiotiques représente un risque majeur de santé publique (Risques biologiques en Suisse, Rapport de la Commission fédérale d'experts pour la sécurité biologique, novembre 2019, <https://www.efbs.admin.ch/fr/recommandations/opinions-sur-des-questions-dactualite/#c6216>).

Le deuxième objectif de cet article est de décrire les méthodes actuelles permettant de prédire la susceptibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques.

Familles d'antibiotiques

Rappelons que les antibiotiques d'une même famille ont tous la même structure chimique (aussi appelée leur «noyau») qui leur confère leurs propriétés antibactériennes spécifiques. Ainsi à titre d'exemple, les dérivés de la pénicilline appelés couramment les bêtalactamines ont tous un noyau bêtalactame qui a pour cible la «penicillin binding protein», une transpeptidase bactérienne impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycan, un constituant essentiel de leur paroi. Les autres agents bloquant la synthèse de la paroi bactérienne tels que la fosfomycine ou la vancomycine ne font pas partie de la même famille puisqu'ils ne possèdent pas ce noyau bêtalactame. Ils bloquent donc à un autre niveau la synthèse du peptidoglycan. La fosfomycine agit sur

Tableau 1. Quelques familles d'antibiotiques et leur cible

Famille d'antibiotiques	Année de mise sur le marché	Cible ou mode d'action
Sulfamidés	1935	Analogue métabolique
Bêtalactamines	1939	Synthèse de la paroi
Tétracyclines	1939	Synthèse des protéines
Aminosides	1950	Synthèse des protéines
Macrolides	1952	Synthèse des protéines
Glycopeptides	1958	Synthèse de la paroi
Streptogramines	1962	Synthèse des protéines
Quinolones	1962	Synthèse de l'ADN

1 Institut de Microbiologie, Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV) et Université de Lausanne (UNIL)

2 Klinische Bakteriologie und Mykologie, Universitätsspital Basel & Applied Microbiology Research, Universität Basel

3 Laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Genève (HUG)

l'enzyme MurA, qui est la première enzyme impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycan, alors que la vancomycine va agir sur la synthèse du peptide, au niveau de la liaison D-ala, D-ala. D'autres antibiotiques peuvent aussi interférer avec la biosynthèse du peptidoglycan, comme la tunicamycine qui agit sur l'enzyme MurG ou la bacitracine qui agit sur les pyrophosphatases.

Notons qu'au sein d'une même famille d'antibiotiques, par exemple les bêtalactamines, il peut y avoir une différence quant à (i) leur capacité d'atteindre leur cible, et (ii) leur capacité à résister à l'hydrolyse par des enzymes bactériennes (les bêtalactamases, en l'occurrence). Ainsi, les antibiotiques d'une même famille se différencient par (i) leur spectre d'action, étroit ou large, et (ii) leurs propriétés pharmacologiques (faible pénétration de la barrière hématoencéphalique pour la co-amoxicilline et la pipéracilline-tazobactam par exemple, versus une bonne pénétration de l'ampicilline).

Notons enfin que le spectre d'action d'un antibiotique peut être différent au sein d'une même famille d'antibiotiques et peut se réduire avec l'apparition de souches résistantes. La résistance va donc varier en fonction du temps, de la région concernée et de la provenance des souches (communautaires ou hospitalières).

Mécanismes de résistance

On distingue quatre principaux mécanismes conduisant à la résistance aux antibiotiques:

- le premier est lié à l'action d'enzymes qui inactivent l'antibiotique (par exemple, les bêtalactamases qui inactivent les dérivés de la pénicilline;
- le deuxième est lié à la modification de la cible de l'antibiotique;
- le troisième concerne l'altération des récepteurs ou la diminution de la perméabilité de la membrane, qui réduisent l'entrée d'un antibiotique dans la cellule bactérienne;
- et enfin le dernier mécanisme est le refoulement des antibiotiques hors de la cellule par des pompes bactériennes.

Les résistances

Les résistances peuvent être soit naturelles, soit acquises. Les résistances na-

turelles sont par définition de nature chromosomique alors que les résistances acquises peuvent être chromosomiques ou plasmidiques. Parmi les résistances acquises, on distingue celles qui sont dues à des mutations au niveau de l'ADN chromosomique et celles liées à des transferts de gènes sur des plasmides ou d'autres éléments mobiles insérés dans le chromosome bactérien (îlots génomiques, cassettes ...).

Le transfert de ces gènes de résistance peut se faire par transformation (introduction d'ADN natif au sein d'une bactérie) lors d'un choc chimique, thermique ou électrique permettant l'augmentation de la perméabilité membranaire à l'entrée de cet ADN (c'est une méthode fréquemment utilisée par les laboratoires de recherche). La transduction (généralement médiée par des phages), la transposition (transfert de transposons qui typiquement se voit chez les bactéries Gram positives), la conjugaison (grâce au système Tra codé sur divers plasmides principalement chez les bacilles Gram négatifs) sont d'autres modalités d'échanges de gènes de résistance. On peut également observer le transfert de gènes par des cassettes (résistance à la méthicilline chez les staphylocoques dorés) ou par des îlots génomiques (*Acinetobacter baumannii*).

D'une manière générale, et quel que soit le mécanisme impliqué, il y a généralement quelques clones résistants qui seront sélectionnés par l'exposition de la population bactérienne à l'antibiotique. Ces clones résistants étant sélectionnés, ils vont pouvoir se répandre, coloniser des personnes en bonne santé et finalement causer des cas groupés d'infections résistantes, voire des épidémies. Ainsi, si l'on veut lutter contre l'augmentation des résistances acquises, il est nécessaire à la fois de limiter l'utilisation des antibiotiques (qui sélectionnent les clones résistants) et de faire un contrôle de la dissémination des souches résistantes, notamment au sein des hôpitaux et des centres de soins (pour limiter la transmission des souches résistantes entre les patients).

Comment tester la susceptibilité d'une bactérie aux antibiotiques?

Le rôle du microbiologiste est de fournir des résultats sur la susceptibilité aux

Antibiotika, Resistenzmechanismen, genetischer Austausch und Antibiotika-Resistenzbestimmung

Auf dem Markt sind zahlreiche Antibiotika erhältlich. Es gibt jedoch relativ wenige Zielstrukturen, gegen die diese Antibiotika wirksam sind, und somit letztendlich auch wenige unterschiedliche Antibiotikagruppen. Da die gegen ein Antibiotikum einer Gruppe erworbenen Resistenzen oft eine Kreuzresistenz gegen die anderen Antibiotika aus derselben Gruppe nach sich ziehen, ist es angebracht, sich Gedanken über die Zunahme der erworbenen Resistenzen zu machen. Es sollte folglich dafür gesorgt werden, dass der Selektionsdruck durch einen adäquaten Einsatz von Antibiotika verringert und die Übertragung resistenter Klone mithilfe von epidemiologischen und Infektionsschutzmassnahmen verhindert wird. Zur Verringerung des Selektionsdrucks ist insbesondere die Verordnung einer gezielten Antibiotikabehandlung wichtig. Diese wird hauptsächlich durch eine Antibiotika-Resistenzbestimmung ermöglicht, die von den Laboratorien mit hoher Zuverlässigkeit und innerhalb kürzester Zeit durchgeführt wird. Die Identifizierung von Mikroorganismen (sehr oft mittels MALDI-TOF) spielt ebenfalls eine grosse Rolle im Hinblick auf die Möglichkeit einer Antibiotika-Deeskalation [3]. Hierzu stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung; Zukunftstechniken sowie die Automation stellen ebenfalls vielversprechende Strategien dar.

antibiotiques. Ceci peut se faire par des méthodes phénotypiques (basées sur la culture) et/ou par la détection de mécanismes de résistance (basée sur la biologie moléculaire). Les résultats du laboratoire de microbiologie doivent être bien entendu standardisés et contrôlés. Le «gold standard» a été longtemps la mesure de la concentration minimale inhibitrice en bouillon (tube ou microplaque). Le test epsilométrique (E test) sur des géloses a permis de simplifier la mesure de la concentration minimale inhibitrice, et la réaliser en routine, dans les cas qui le nécessitent.

Il existe de nombreux systèmes automatisés ou miniaturisés qui permettent également de donner des indications sur la susceptibilité d'une souche bactérienne. Cependant, leurs résultats se basent généralement sur la détection d'une absence de croissance, en présence d'une concentration précise d'antibiotique, très proche de la valeur définissant sa susceptibilité ou sa résistance (break-point).

Ces systèmes ont permis d'automatiser les tests et permettent de rendre des résultats dans un délai minimal de six à huit heures, souvent davantage. L'utili-



sation des tests de diffusion avec disques (méthode de Kirby-Bauer) est également largement utilisée et se base sur l'inoculation d'une gélose de type Müller-Hinton avec une culture pure de la bactérie à tester, à une concentration précise (McFarland de 0,5). On y ajoute ensuite un disque imprégné d'antibiotique et on effectue les lectures après 18 à 24 heures d'incubation à 35–37°. La lecture des diamètres des zones d'inhibition se fait au millimètre près et ce diamètre correspond pour chaque couple antibiotique/bactérie à une susceptibilité, à une valeur intermédiaire ou résistante, selon les critères d'interprétation. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de déposer plusieurs disques d'antibiotiques différents sur une seule gélose, de s'assurer visuellement que la souche est bien isolée et qu'elle ne contient pas de sous-population résistante (hétérorésistance). Enfin, cette technique va bénéficier largement de l'automatisation de la microbiologie [1].

Il existe principalement deux critères d'interprétation: les critères européens (Eucast) et les critères américains (CLSI). Un avantage supplémentaire des tests de diffusion avec disques est la possibilité d'observer des synergies ou des antagonismes entre antibiotiques, et donc de prédire certains mécanismes de résistance dont la présence d'AmpC (inhibition entre ceftriaxone et imipénem) ou d'ESBL (synergie entre l'amoxicilline-clavulanate et certaines céphalosporines). Notons que les tests de synergie et d'antagonisme doivent être interprétés avec prudence et ne font pas partie des critères Eucast.

Détection des carbapénémases

Les différents laboratoires diagnostiques ont développé des approches différentes pour tester la présence de carbapénémases (enzymes conduisant à la résistance aux carbapénèmes). Ainsi l'utilisation de tests colorimétriques permet de détecter la présence de carbapénémase avec une sensibilité acceptable dans un délai très court. Cependant des tests moléculaires plus spécifiques permettent d'identifier la

présence de carbapénémases avec une plus grande fiabilité et précision. Ainsi dans de nombreux laboratoires, des PCR spécifiques sont utilisées pour détecter la présence des différentes carbapénémases fréquemment rencontrées en Suisse.

Au vu du nombre croissant de mécanismes, la génomique bactérienne sur souche va probablement bientôt compléter, voire supplanter, ces PCR multiples. A Lausanne, Genève et Bâle, l'analyse par génomique de la résistance peut être effectuée en moins de 48 heures et donne des résultats fiables, congruents avec les résultats basés sur des tests moléculaires de type PCR. Cependant, les tests phénotypiques restent encore idéaux à ce jour compte tenu de l'absence d'étalon or et de la possible présence de gènes de résistance non encore connus ou non détectables de manière simple. En effet, il est très difficile en génomique d'identifier les pompes à efflux puisqu'il existe de nombreux transporteurs et que leur spécificité de substrat n'est pas précise. De même, leur seule présence n'implique pas toujours la résistance, car elles peuvent ne pas être actives.

A l'avenir, il est possible que des tests basés sur la microscopie à force atomique et sur la détection de nanomouvements constituent des tests phénotypiques fiables avec des résultats rapides. Le «proof of principle» a été démontré pour *E. coli* isolés d'hémocultures [2]. Le paradigme derrière la microscopie à force atomique est qu'on ne va plus utiliser ni la détection d'un gène ou de mutations, ni la croissance d'une bactérie mais simplement ses mouvements en présence ou en l'absence d'un antibiotique donné. Lorsque les mouvements baissent de plus de 40 %, le germe peut être considéré comme susceptible à l'antibiotique. Cette approche est prometteuse mais doit encore être validée.

Conclusions

En conclusion, il y a de nombreux antibiotiques sur le marché mais relativement peu de cibles contre lesquelles agissent ces antibiotiques et donc finalement peu de familles d'antibiotiques

différentes. Ainsi, les résistances acquises contre un antibiotique d'une famille conférant souvent une résistance croisée avec les autres antibiotiques de la même famille, il y a lieu de s'inquiéter de l'accroissement des résistances acquises. Il faut donc veiller à réduire la pression de sélection grâce à un usage adéquat des antibiotiques et prévenir la transmission de clones résistants par des mesures épidémiologiques et de contrôle de l'infection. Pour réduire la pression de sélection, il est particulièrement important de donner des traitements antibiotiques ciblés et ceci est possible grâce aux tests qui permettent de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de manière fiable et avec des délais les plus courts possibles. L'identification microbienne (très souvent par MALDI-TOF) joue aussi un rôle majeur dans la possibilité de désescalade antibiotique [3]. Ainsi, de nombreuses techniques sont disponibles et des techniques émergentes (comme la nanomotion) ainsi que l'automatisation représentent des pistes prometteuses.

Correspondance
gilbert.greub@chuv.ch

Références

1. Cherkaoui A, Renzi G, Fischer A, Azam N, Schorderet D, Vuilleumier N, Schrenzel. Comparison of the Copan WASPLab incorporating the BioRad expert system against the SIRscan 2000 automatic for routine antimicrobial disc diffusion susceptibility testing. *J. Clin Microbiol Infect.* 2019 Nov 13.
2. Stupar P, Opota O, Longo G, Prod'hom G, Dietler G, Greub G, Kasas S. Nanomechanical sensor applied to blood culture pellets: a fast approach to determine the antibiotic susceptibility against agents of bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Jun; 23(6): 400–405.
3. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis.* 2013 Apr; 56(8): 1101–7.