

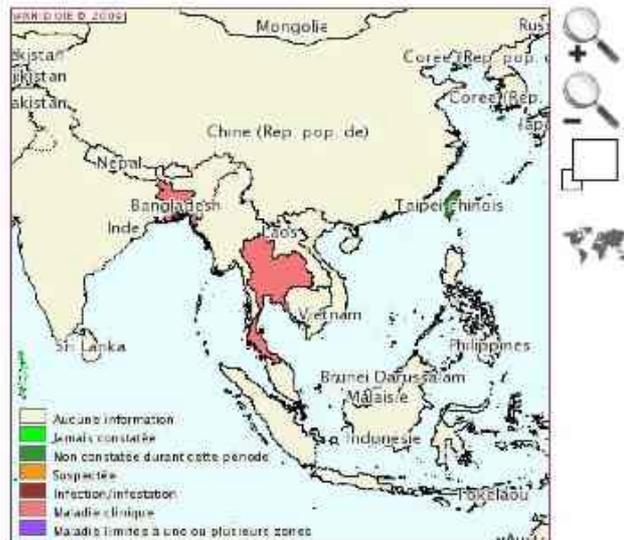
RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES MECANISMES

Pr. Émérite A. PHILIPPON
Faculté de Médecine Paris Descartes



Cartes de distribution des maladies: Brucellose (*Brucella abortus*)

Cliquez sur la carte pour la recentrer



The page took 1 second to load. Echelle 1 : 108 000 000 (approx)

CONSTAT ACTUEL

Antibiotiques : nombre apparent élevé, mais peu de nouvelles molécules

Résistance : en augmentation souvent, quelquefois élevée, de plus en plus de multirésistance (BMR) mais  si meilleure prescription

Mécanismes de résistance :

Comment une bactérie devient résistante ?

Quelle diversité ?

Intérêt en thérapeutique ?

La lecture interprétative de l'antibiogramme (CA-SFM)

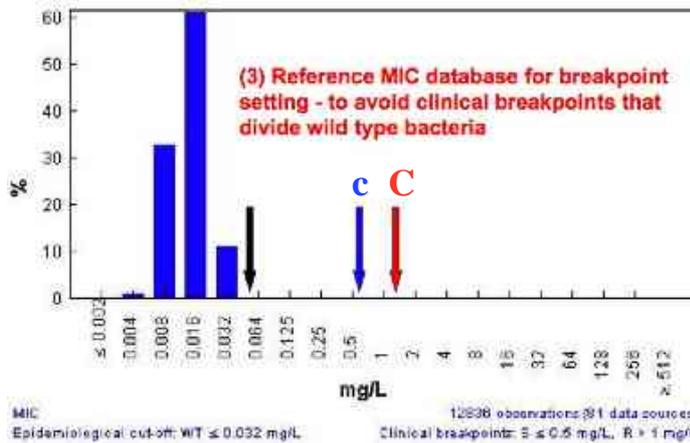
- Celle-ci, fondée sur la connaissance des **phénotypes de résistance** conduit dans certains cas à transformer un résultat initialement catégorisé S en résultat I ou R en raison d'un risque d'échec thérapeutique.

- De plus, pour quelques couples bactérie-antibiotique, malgré une catégorisation « sensible », le **risque accru de sélection *in vivo* de mutants** résistants justifie un commentaire particulier destiné au clinicien.

- Ceci requiert au préalable l'**identification correcte** de la souche bactérienne et une méthode d'antibiogramme standardisée.

- L'**identification formelle** du (ou des) mécanisme(s) de résistance impliqué(s) impose la mise en place de techniques spécifiques.

- Les **règles** de lecture interprétative sont mentionnées, pour certaines espèces ou pour certains groupes bactériens, dans les notes.....
(cf communiqué annuel)



E. coli
Ciprofloxacin

EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April 2008

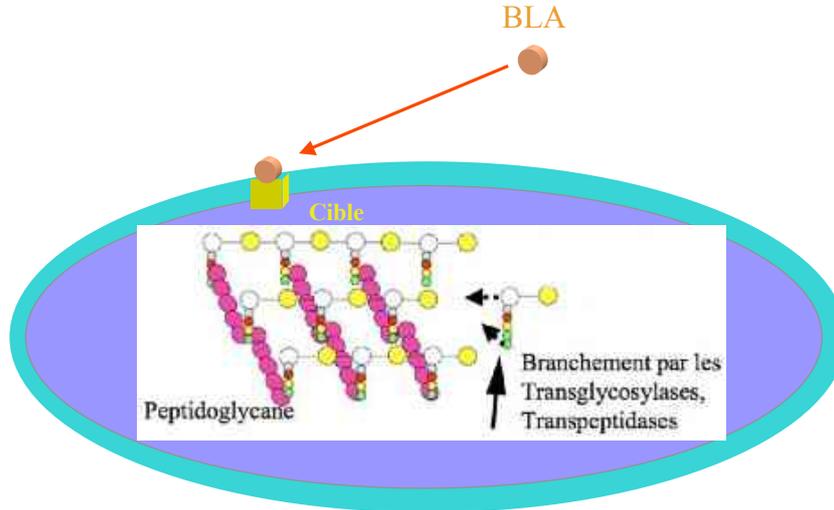
MECANISMES DE RESISTANCE (ACQUISE OU NON)

Mécanismes biochimiques

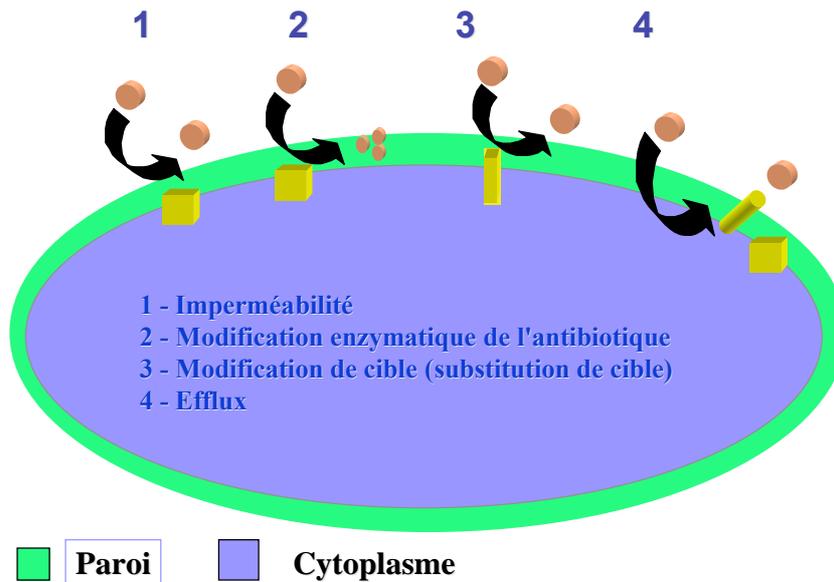
- Imperméabilité
- Efflux
- Modification enzymatique de l'antibiotique
- Modification de cible (affinité ou substitution de cible)
- Protection de la cible ?

La bonne connaissance des mécanismes découle du mode d'action

MODES D'ACTION DES BETA-LACTAMINES

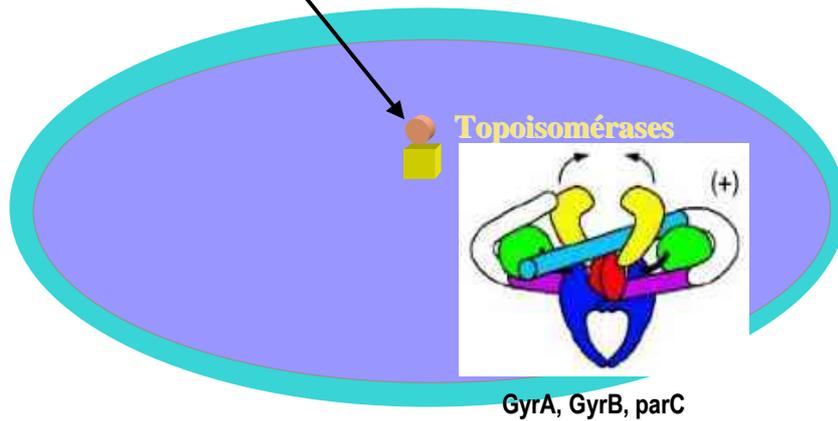


MECANISMES DE RESISTANCE

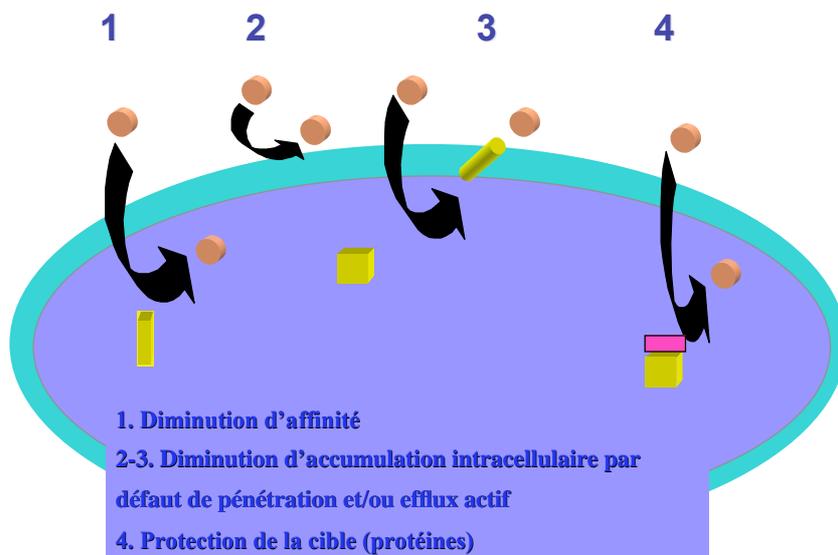


MODE D'ACTION : EXEMPLE 2

QUINOLONES
FLUOQUINOLONES



MECANISMES DE RESISTANCE



Mécanismes biochimiques

. **Imperméabilité**

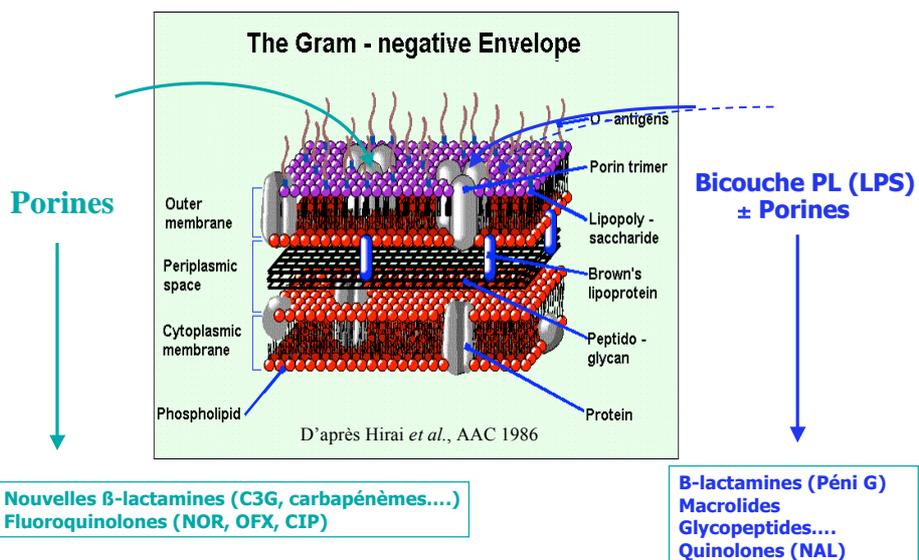
. **Efflux**

.

.

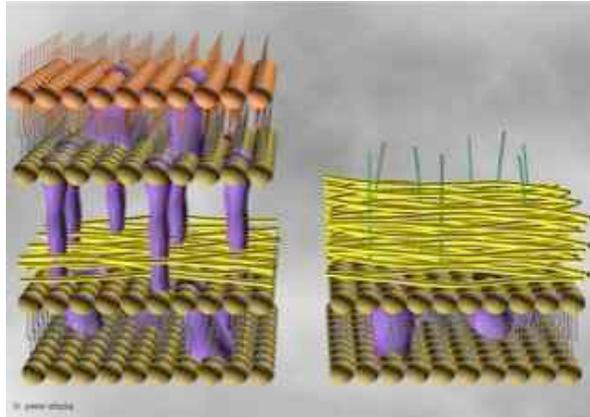
.

RESISTANCE INTRINSEQUE DES BGN



GRAM -

GRAM +



Compte tenu des différences structurales, la **résistance intrinsèque des GRAM +** est faible pour les antibiotiques hydrophobes de type B-lactamines (Péni G) - Macrolides - Glycopeptides....

On notera l'exception des **Quinolones** comme l'acide nalidixique, la résistance intrinsèque est élevée en raison d'une mauvaise affinité naturelle des cibles (*gyrA*....)

IMPERMEABILITE - EFFLUX

E. coli

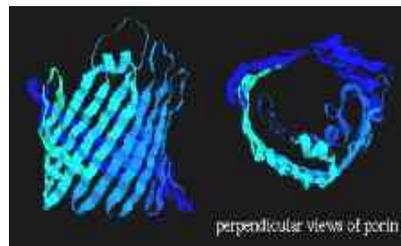
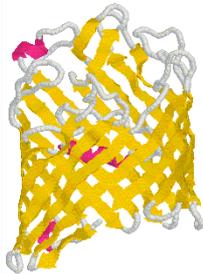
P. aeruginosa

Porines (trimères) OmpA, OmpC, **OmpF**

OprD2

Monomère OmpF

Trimère OmpF



Résistance croisée et associée

Résistance isolée à l'imipénème



IMPERMEABILITE - EFFLUX

Diminution de la perméabilité membranaire chez *E. coli* (2)

Mutation	Phénotype	ATB sélectionnant	CMI (µg/ml) :				
			NAL	NOR	CIP	TC	CM
WT	OmpC ⁺ OmpF ⁺	-	4	0,08	0,02	4	8
<i>ompF</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻	-	8	0,16	-	4	8
<i>ompC</i>	OmpC ⁻ OmpF ⁺	-	4	0,08	-	-	8
<i>nfxB</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻	NOR	16	0,32	0,04	16	32
<i>norB</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻	NOR	16	0,32	0,08	-	16
<i>norC</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻ (+mutation LPS)	NOR	1	0,32	0,04	-	4
<i>cfxB</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻	CIP	16	0,32	0,08	8	32
<i>marA</i>	OmpC ⁺ OmpF ⁻	TC, CM	16	0,32	0,16	32	32

D'après Hooper & Wolfson, *in* Quinolone antimicrobial agents 1993

NAL, acide nalidixique; NOR, norfloxacine; CIP, ciprofloxacine; RIF, rifampicine, CM, chloramphénicol ; TC, tétracycline;



Résistance quelquefois génétique mais clinique ? (CIP)



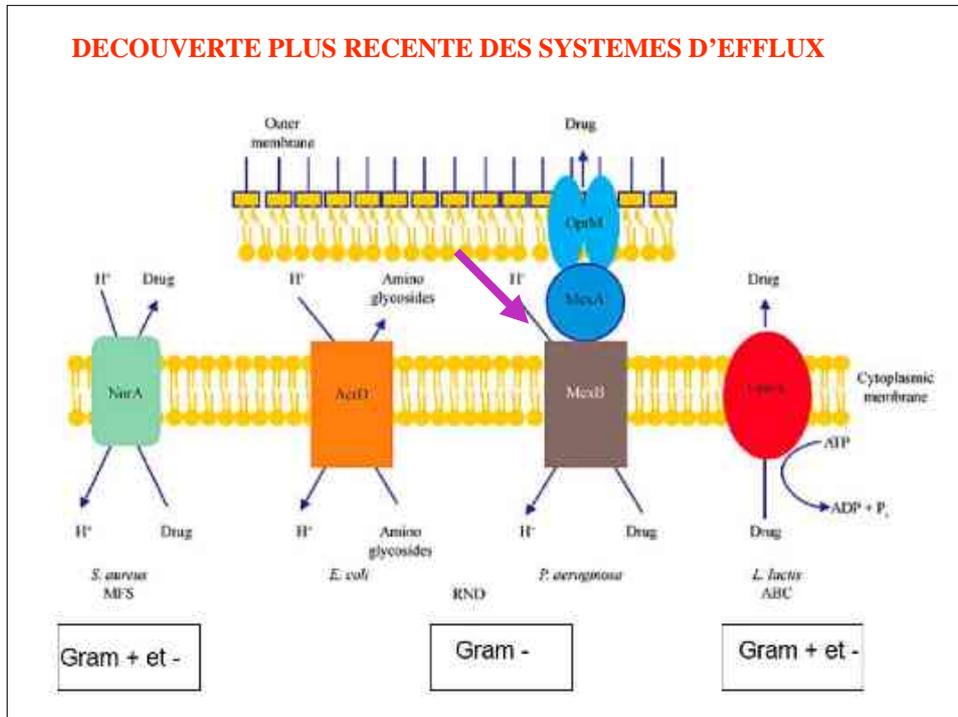
EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, version 1, April 2008

Table 1: Intrinsic resistance (R) in Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae are also intrinsically resistant to penicillin G, glycopeptides, fusidic acid, macrolides (with some exceptions **1**), lincosamides, streptogramins, rifampicin, daptomycin and linezolid.

1 Azithromycin is effective in vivo for the treatment of typhoid fever and erythromycin may be used to treat travellers' diarrhoea.

DECOUVERTE PLUS RECENTE DES SYSTEMES D'EFFLUX



Efflux actif chez *E. coli*

Résistance acquise : hyper-expression de AcrAB due à des mutations dans *marR* (↑ MarA) ou *acrR* (↓ AcrR)

Génotype	CMI (µg/ml)				
	TC	AMP	NAL	RIF	CM
WT	1,25	2,5	5	12,5	5
Mutant <i>marR</i>	5	5	10	25	10
Δ <i>acrAB</i>	0,3	0,6	0,6	5	0,6
Mutant <i>acrR</i>	2,5	2,5	10	12,5	10
Mutant <i>marR</i> Mutant <i>acrR</i>	10	10	20	12,5	>160

TC, tétracycline; AMP, ampicilline; NAL, acide nalidixique; RIF, rifampicine, CM, chloramphénicol

Souches hautement R aux FQ = mutations dans QRDR (2-4) avec hyper-expression de AcrAB (x2-5)

ANTIBIOTIQUES IMPLIQUES

		Protéines identifiées
Imperméabilité	B-lactamines macrolides tétracyclines quinolones fosfomycine chloramphénicol..	Omp (F), Opr (D2) Méthylases TET
Efflux	β-Lactamines macrolides lincosamides tétracyclines quinolones-FQ	Mex, Mar, AcrAB-TolC..... MFS (MefA), MsrA, ABC LsA TET(A)-(L)

Attention : Résistance associée et croisée
Prescription raisonnée : rôle sélectionnant de qq AB

MECANISMES DE RESISTANCE ACQUISE

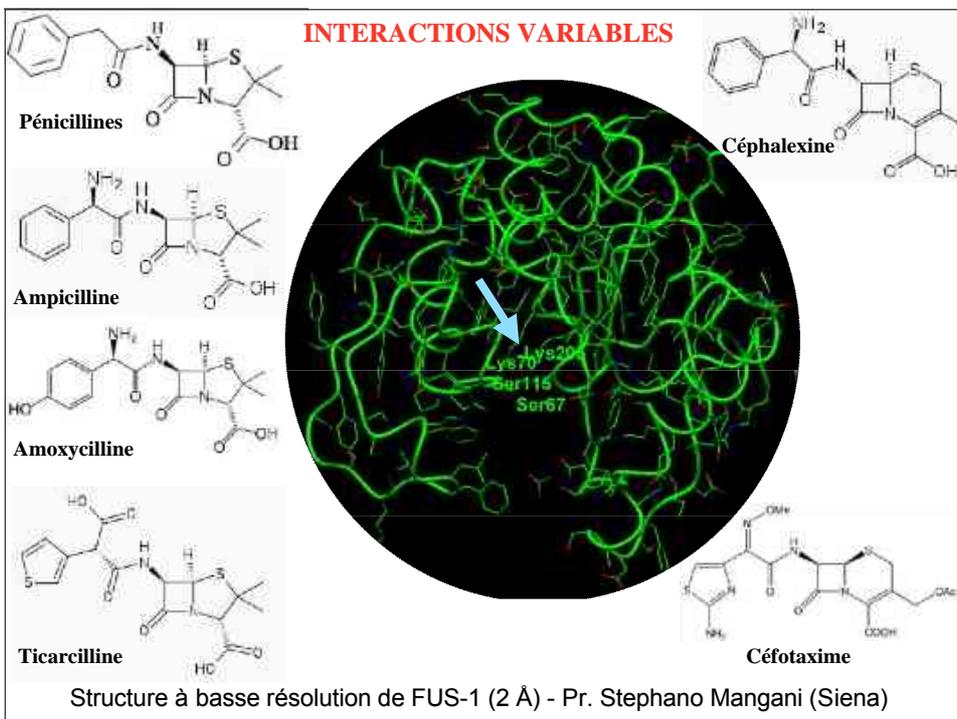
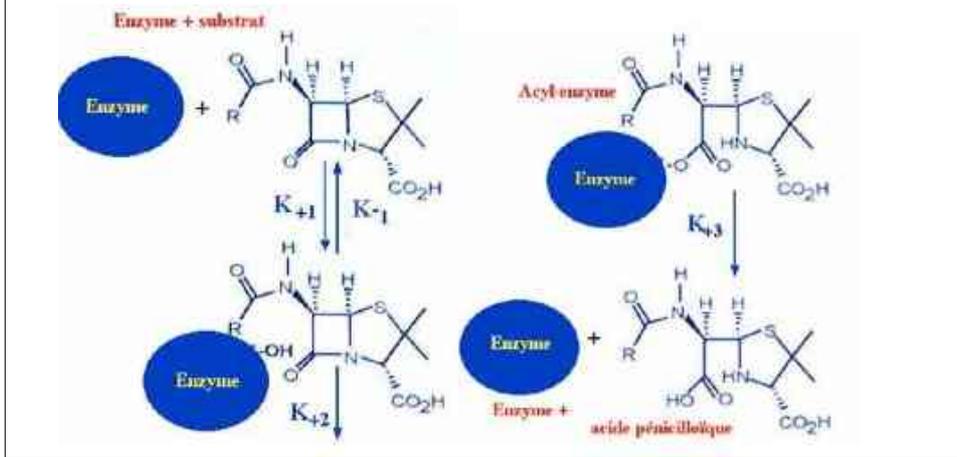
Mécanismes biochimiques

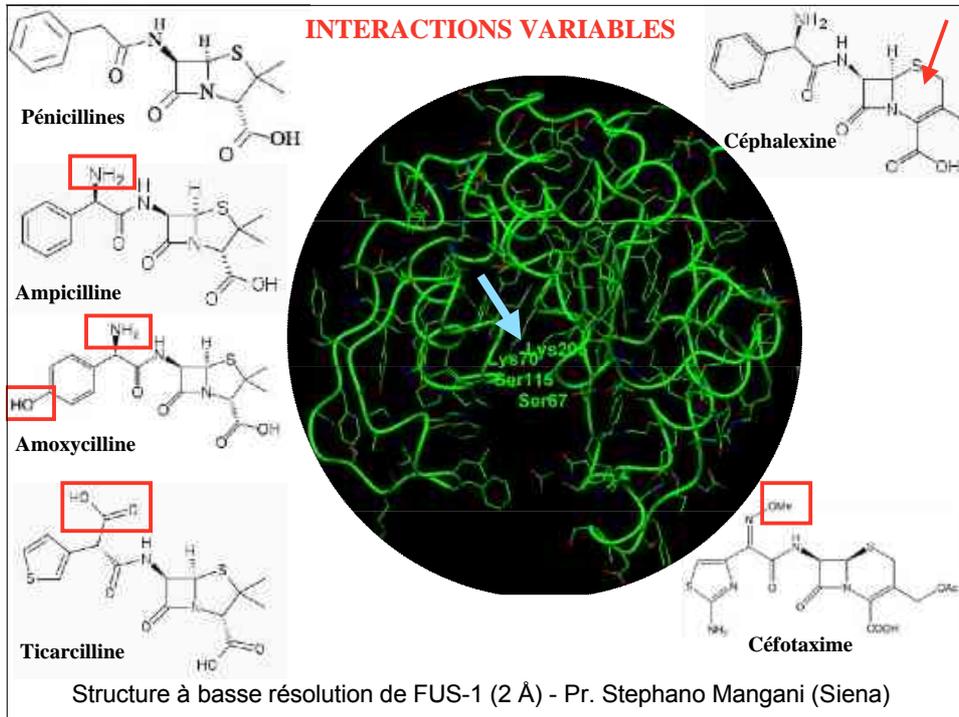
-
-
- **Modification enzymatique (détoxification) de l'antibiotique**
- **Modification de cible (affinité ou substitution de cible)**
- **Protection de la cible ?**

Principal mécanisme bactérien

MODIFICATION ENZYMATIQUE /DETOXIFICATION

Les **β -lactamases** sont des **enzymes d'inactivation** de type sérine (classes A, C et D) ou métalloenzymes (classe B) dont les substrats sont des β -lactamines, constituant la principale et la plus importante famille d'antibiotiques, pouvant être classée en sous-groupes selon la structure du noyau de base (pénème, oxapénème, pénème, céphème, oxacéphème, azétidone).





BGN : Espèces d'entérobactéries selon le groupe

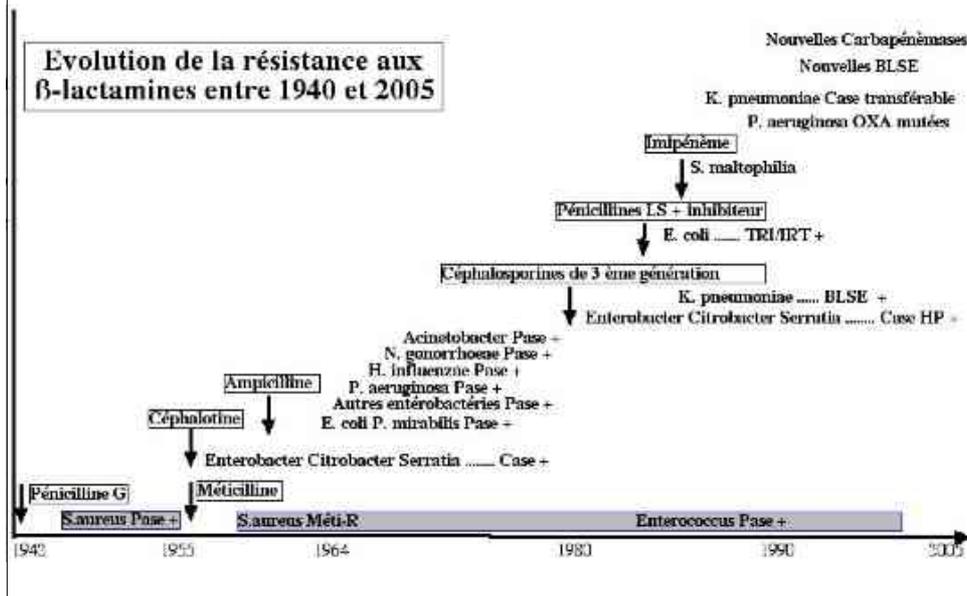
Groupe 1	E. coli, P. mirabilis, Salmonella enterica, Shigella spp
Groupe 2	K. pneumoniae, K. oxytoca, C. koseri, E. hermannii.....
Groupe 3	E. cloacae, E. aerogenes, C. freundii, S. marcescens.....
Groupe 4	Y. enterocolitica
Groupe 5	P. vulgaris, P. penneri, K. ascorbata, S. fonticola, R. aquatilis

Intrinsic resistance (R) in Enterobacteriaceae (2008)

Rule no.	Organisms	Ampicillin	Amoxicillin-clavulanate	Ticarcillin	Piperacillin	Cefazolin	Cefoxitin	Cefamandole	Cefuroxime	Aminoglycosides	Tetracyclines/igecycline*	Polymyxin B/Colistin	Nitrofurantoin
1.1	<i>Citrobacter koseri</i>	R		R	R								
1.2	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R			R	R						
1.3	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R			R	R						
1.4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	R			R	R						
1.5	<i>Escherichia hermannii</i>	R		R	R								
1.6	<i>Hafnia alvei</i>	R	R			R	R						
1.7	<i>Klebsiella</i> spp.	R		R	R								
1.8	<i>Morganella morganii</i>	R	R			R			R		R	R	R
1.9	<i>Proteus mirabilis</i>										R	R	R
1.10	<i>Proteus vulgaris</i>	R				R		R	R		R	R	R
1.11	<i>Proteus penneri</i>	R				R		R	R		R	R	R
1.12	<i>Providencia rettgeri</i>	R	R			R				R [†]		R	R
1.13	<i>Providencia stuartii</i>	R	R			R				R [†]		R	R
1.14	<i>Serratia marcescens</i>	R	R			R		R	R	Note [†]		R	
1.15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R	R	R	R	R	R					
1.16	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>											R	

E. coli, *Shigella*, *Salmonella* S S S S S S S S S S S S

350 Bêta-lactamases identifiées depuis 1940 - Nombreux types différents



BETA-LACTAMASES ACQUISES / SPECTRE D'INACTIVATION

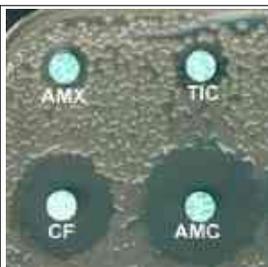
B-Lactamases: spectres d'inactivation

	Pnse	BLSE	IRT TRI	Case HP	Case Tra+	Case BLSE	IMP VIM
Amoxicilline	+	+	+	+	+	+	+
+ Acide Clavulanique	+	-	+	+	+	+	+
Ticarcilline	+	+	+	+	+	+	+
+ Acide Clavulanique	+	-	+	+	+	+	+
Piperacilline	+	+	+	+	+	+	+
+ Tazocilline	+	-	+	+	+	+	+
Mecillimam	+	+	+	.	.	±	.
Cefalotine	+	+	-	+	+	+	+
Cefamandole	+	+	.	+	+	+	+
Cefuroxime	-	+	.	+	+	+	+
Cefoxitine	.	+	.	+	+	+	+
Cefotetan	.	-	.	+	+	+	+
Ceftazidime	.	+	.	+	+	+	+
Cefotaxime	.	+	.	+	+	+	+
Ceftriaxone	.	+	.	+	+	+	+
Aztreconam	.	+	.	+	+	+	.
Cefepime	.	+	.	.	.	+	+
Cefpirome	.	+	.	.	.	+	+
Imipeneme	.	-	.	.	.	-	+
Meropeneme	-	+

PASE, pénicillinase; **BLSE**: β -lactamase à spectre élargi/étendu; **IRT/TRI**, TEM résistant aux inhibiteurs; **CASE HP**, céphalosporinase hyperproduite; **pCASE**, céphalosporinase hyperproduite; **BLSE CASE**, céphalosporinase à spectre élargi ; **carbapénémases** (VIM, IMP.....)
+, inactivation; **-**, stabilité

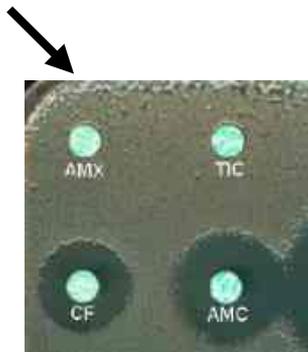
Règles de lecture interprétative

K. PNEUMONIAE : EVOLUTION



Pase bas niveau

Résistance naturelle
ou intrinsèque



**Pase haut niveau
(TEM)**

R. acquise
R. plasmidique
R. transposable

«**!Broad-spectrum
 β -lactamase!**»



CAMPUS DE MICROBIOLOGIE MÉDICALE

NOM	DETERMINISME HABITUEL
ABA-1	<i>Acinetobacter baumannii</i> AmpC
ACC-1	<i>Ambler Class C</i>
ACT-1	<i>ACIdaminococcus fermentans</i>
ACT-1	AmpC Type
AER -1	AERomonas
ARI-1	<i>Acinetobacter</i> Resistance Impenem
AshB1	<i>Aeromonas sobria</i>
AST-1	Nocardia ASTeroides
Bcl	Bacillus cereus type I



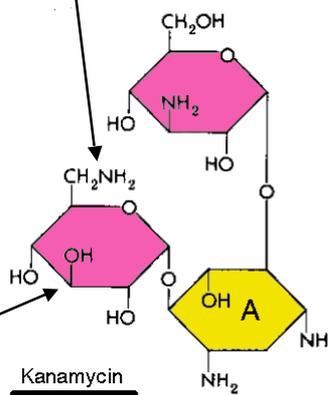
<http://www.microbe-edu.org/>

FAMILLE DES AMINOSIDES

Enzymes inactivatrices

AAC
Aminoglycoside acétyltransférase
Acétylation → Amine libre en x

APH
Aminoglycoside phosphotransférase
P → OH libre



ANT
Aminoglycoside nucléodityltransférase
Adénine → OH libre

GRAM + : TYPES DE RESISTANCE

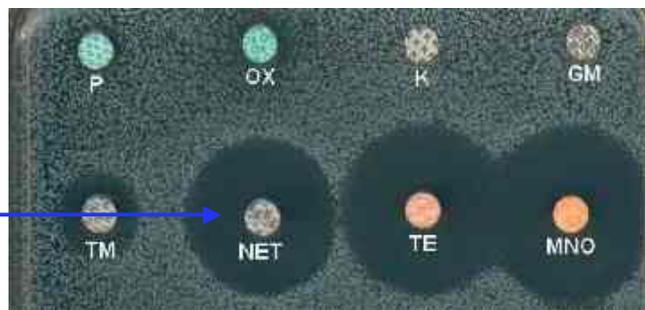
Enzyme	Phénotype de résistance					
APH(3')-III			K			(Ami)
ANT(4'')-II			K	(To)		(Ami)
AAC(6')-APH(2'')	G*	Sis	K	To	(Net)	(Ami)

G, gentamicine; Sis, sisomicine; K, kanamycine; To, tobramycine; Net, nétilmicine; Ami, amikacine

Détection du phénotype puis interprétation (R)

AAC(6')-APH(2'')
Phénotype KTG

S. aureus

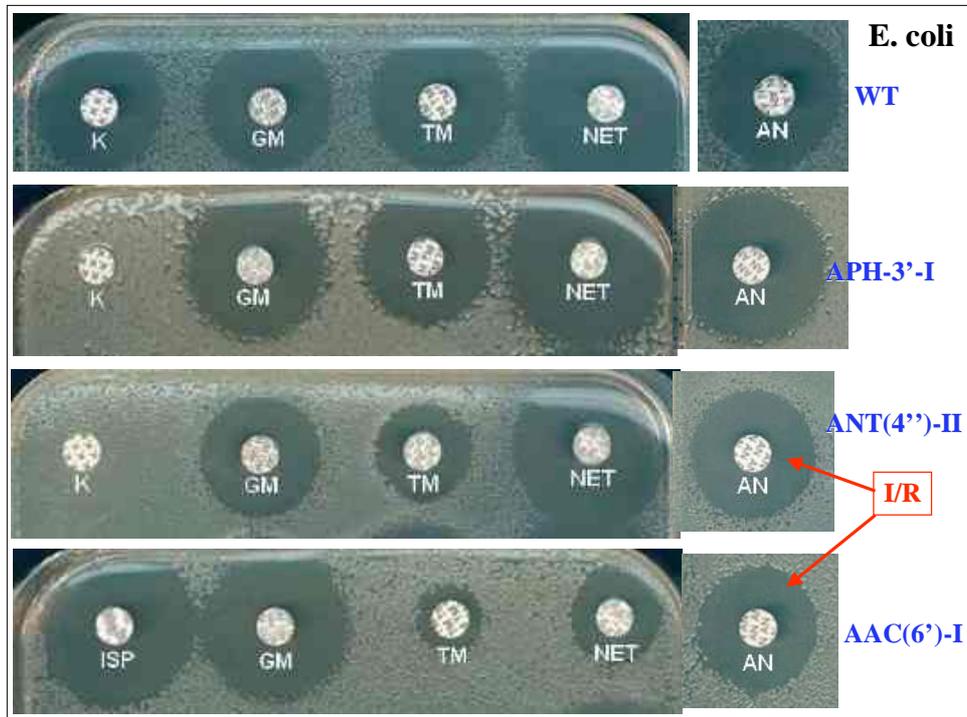


GRAM - : TYPES DE RESISTANCE

Enzyme	Phénotype de résistance					
APH(3'') ANT (3'')	S					
APH(3')-I, -II			K			
APH(3')-VI			K			Ami
AAC(3)-I	G	Sis				
AAC(2'), AAC(3)-VI	G	Sis			Tm	Net
AAC(3)-II, -V	G	Sis	K	Tm	Net	
ANT(2'')	G	Sis	K	Tm		
ANT(4'')-II			K	Tm		Ami
AAC(6')-I		Sis	K	Tm	Net	(Ami)

S, streptomycine; G, gentamicine; Sis, sisomicine; K, kanamycine; Tm, tobramycine; Net, nétilmicine; Ami, amikacine

Il existe probablement d'autres choix thérapeutiques



INACTIVATION/DETOXIFICATION

β-Lactamines	β-Lactamases (> 350)
Aminoglycosides	Phosphotransférases (APH)
«! «! «!	Nucléotidyltransférases (ANT)
«! «! «!	Acétyltransférases (AAC)

NOMBREUSES AUTRES ENZYMES D'INACTIVATION

Macrolides	Phosphotransférases (mphA-C)
Lincosamides	Nucléotidyltransférases (linA, lnuA, linB...)
Streptogramines	Acétyltransférases (vatA-E), lyases (vgbA)
Chloramphénicol	Acétyltransférases (CAT)

MECANISMES DE RESISTANCE ACQUISE

Mécanismes biochimiques

-
-
-
- **Modification de cible (affinité ou substitution de cible)**
- **Protection de la cible ?**

MODIFICATION D’AFFINITE DE LA CIBLE

Bêta-lactamines

PLP (cf **mutation**)

Quinolones-Fluoroquinolones

Topoisomérases II, IV (cf **mutation**)

Aminoglycosides

Protéines **L22**.....

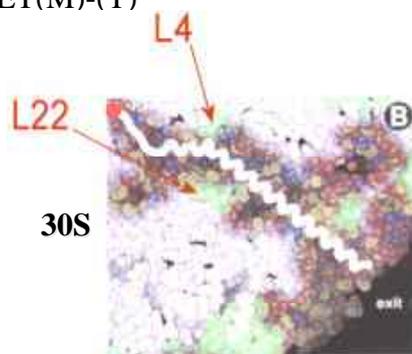
Macrolides

Méthylases (Erm)

Tétracyclines

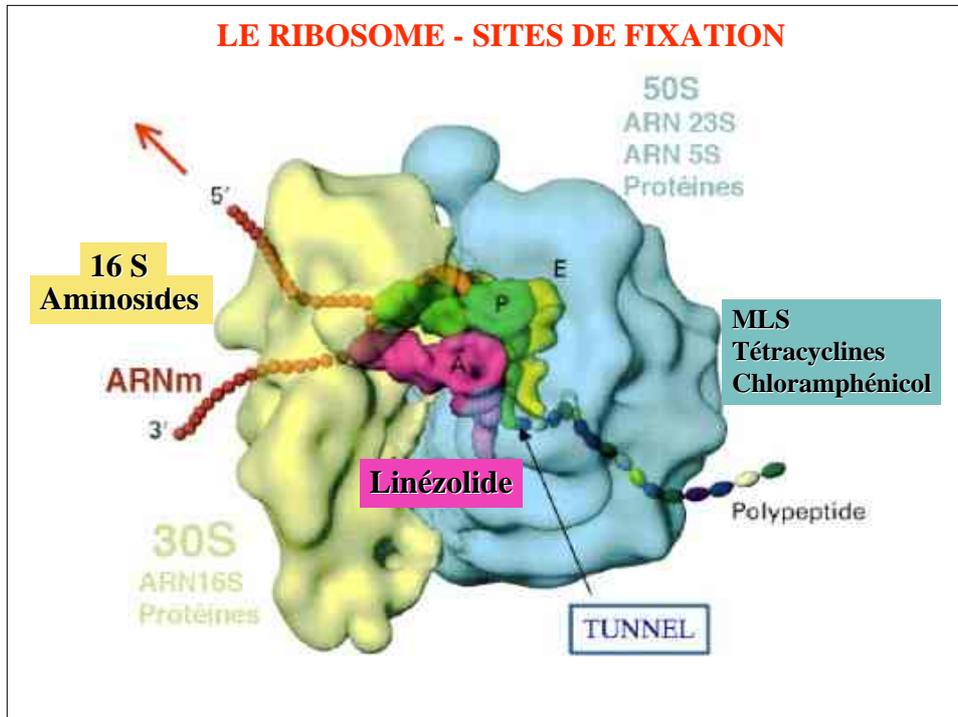
TET(M)-(T)

Phase de Traduction
Ribosome



Nissen P. 2000

LE RIBOSOME - SITES DE FIXATION



SUBSTITUTION DE CIBLES DE MOINDRE AFFINITE

Bêta-Lactamines	PLP2a, autres PLPs
Glycopeptides	VanA, B, C
Sulfamides	DHFR (dihydrofolate réductase)
Triméthoprime	DHPS (dihydroptéroate synthétase)

Staphylococcus aureus

Résistance intrinsèque ou métillo-résistance

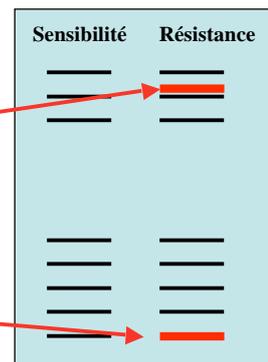
PLP2A hyperproduite, R à toutes les B-lactamines

Entérocoques

PLP5A hyperproduite

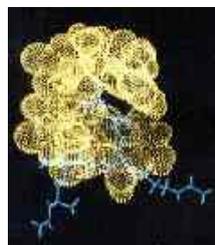
S. pneumoniae

PLP recombinées (cf m. génétiques)



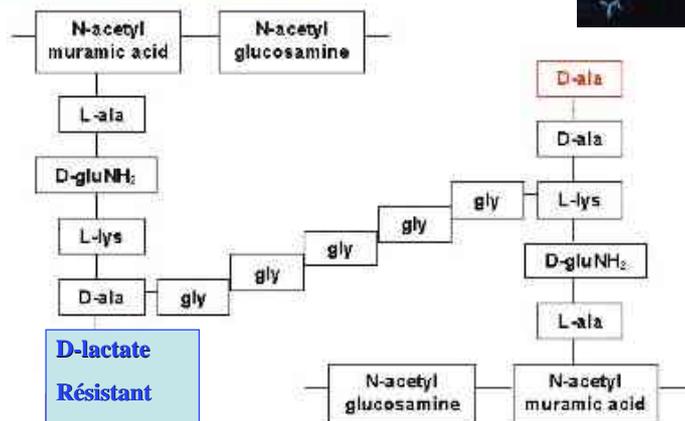
PLP séparées sur un gel

Glycopeptides



biosynthèse

Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*



D-lactate
Résistant

PROTECTION DE LA CIBLE ?????

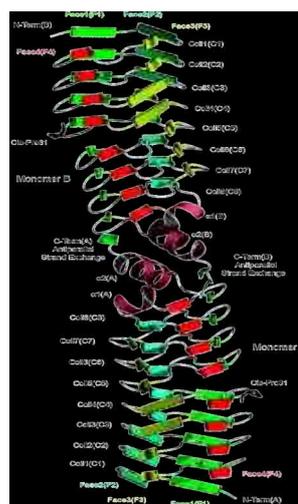
Protéines Qnr

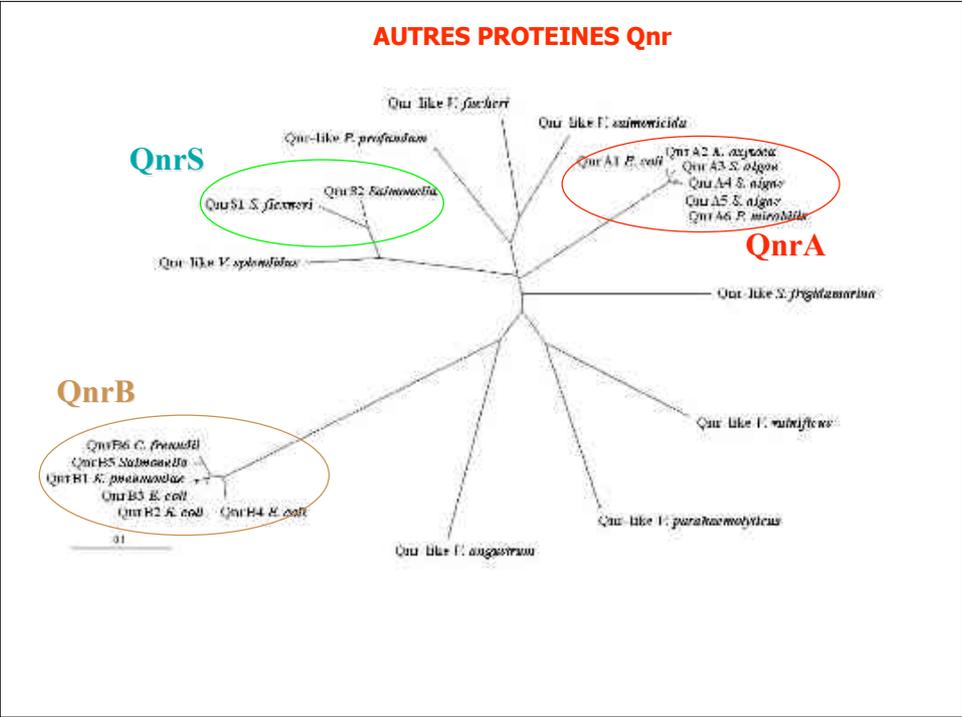
Identification de Qnr (QnrA1) sur le plasmide pMG252 dans 1 souche clinique de *K. pneumoniae* multi-R dont une CASE plasmidique aux USA (Martinez-Martinez *et al.*, Lancet 1998)

Protéine de 218 AA (gène 657 pb) de la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés :
[Ser/Thr/Ala/Val] [Asp/Asn] [Leu/Phe] [Ser/Thr/Arg]
[Gly]

Interaction directe entre QnrA et l'ADN gyrase
Mécanisme exact à préciser

Résistance plasmidique





Activité de la résistance chez *E. coli*

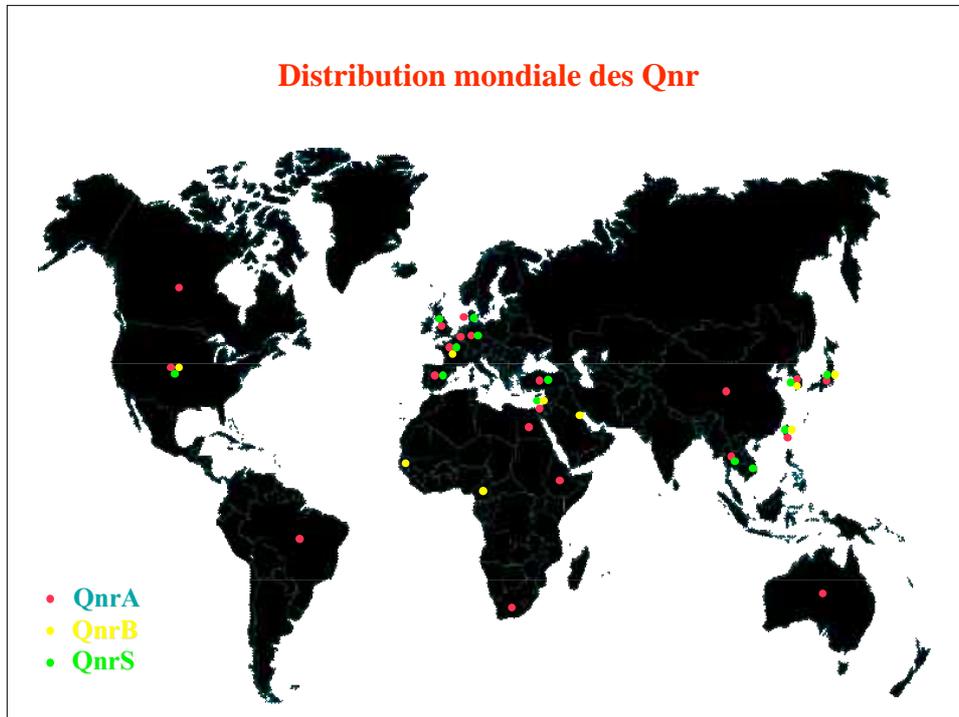
Découverte fortuite lors de l'étude d'une Case plasmidique

Quinolone	CMI (µg/ml) de :		CMI X
	<i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i> J53 + pMG252	
Ac. nalidixique	4	32	8
Norfloxacine	0,125	1	8
Péfloxacine	0,06	2	33
Ciprofloxacine	0,008	0,25	31
Sparfloxacine	0,015	1	66
Lévofloxacine	0,03	0,5	16
Trovafloracine	0,015	1	66

D'après Martinez-Martinez *et al.*, Lancet 1998

Résistance génétique mais en clinique ????

Distribution mondiale des Qnr



MECANISMES DE RESISTANCE ACQUISE

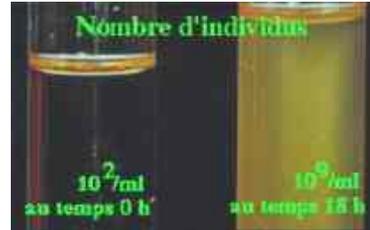
Mécanismes génétiques

- . Variation génotypique ou mutation
- . Transfert de gènes : transformation, conjugaison, transduction
plasmide, transposon, intrégron
- . Association des deux

MECANISMES GENETIQUES: MUTATION

Rappel : modification spontanée ou induite, discontinue, stable, **rare**, spécifique et enfin liée à une modification du génome bactérien (ADN)."

Rare, soit 10^{-5} - 10^{-6} **MAIS**

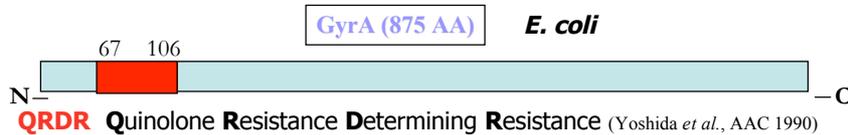


Quelle modification de l'ADN ?

- . mutation ponctuelle : fréquente (quinolones) →
- . insertion de séquence (IS) : rare |
- . modification du gène de structure ou autre (BLSE/HP) →

INTERET MEDICAL IMPORTANT /: Prévention
Choix de l'antibiotique , bonne administration, association (BK)

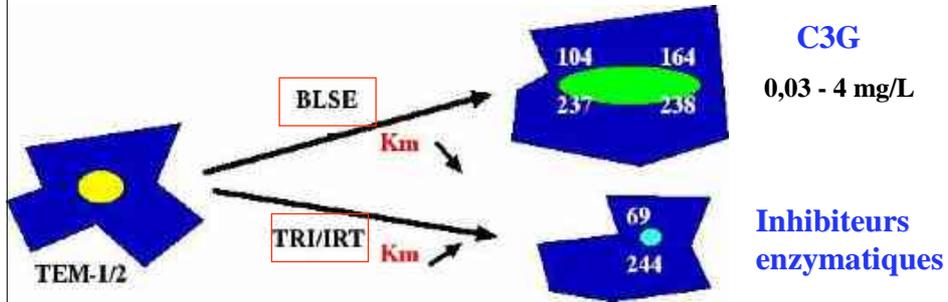
Exemples : 1/ Résistance aux quinolones-BGN



	GyrA		GyrB		ParC		CMI NAL (mg/L)	CMI CIP (mg/L)
	83	87	447	80	84			
WT	Ser	Asp	Lys	Ser	Glu	2-4	0,007-0,25	
	Leu	-	-	-	-	128-256	0,25	
	Leu	-	-	Arg	-	>2000	1	
	Leu	-	-	Ile	Val	512	2	
	Leu	-	-	Arg	-	>2000	4	
	Leu	-	Glu	-	Lys	>2000	4	
	Leu	Tyr	-	-	Lys	>2000	8	
	Leu	Asn	-	-	Lys	>2000	8	
	Leu	Asn	-	Ile	-	>2000	8	
	Leu	Asn	-	Arg	-	>2000	16	
	Leu	Asn	-	Ile	-	>2000	16	
	Leu	Tyr	-	-	Lys	>2000	32	
	Leu	Asn	-	Ile	-	>2000	32	
	Leu	Asn	-	Ile	-	>2000	64	
	Leu	Asn	-	Ile	Val	>2000	64	
	Leu	Tyr	-	Ile	Lys	>2000	128	

D'après Vila *et al.*, AAC 1994 et 1996

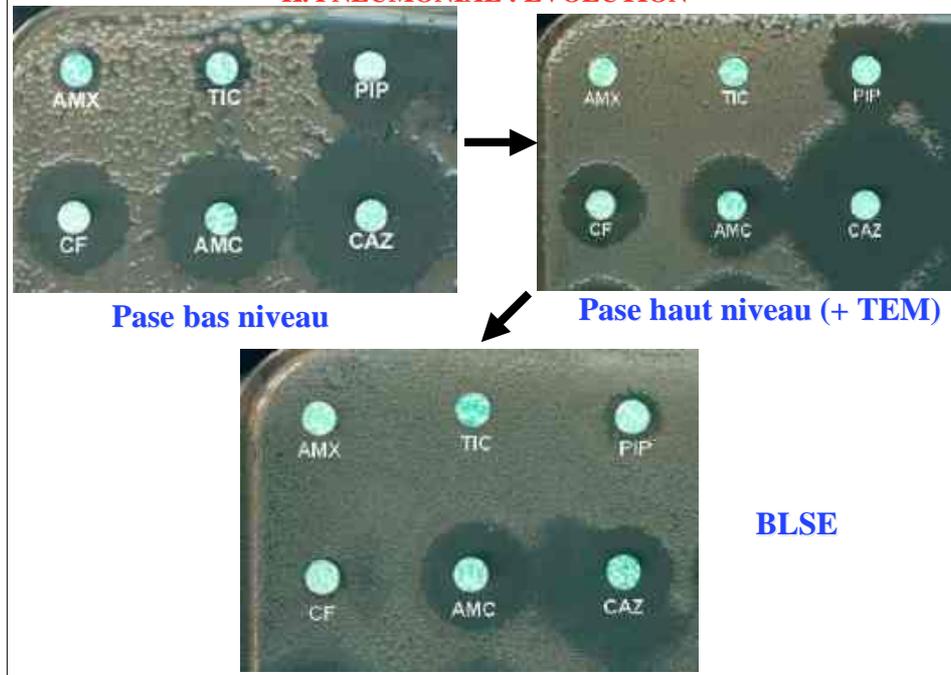
RESISTANCE AUX BETA-LACTAMINES

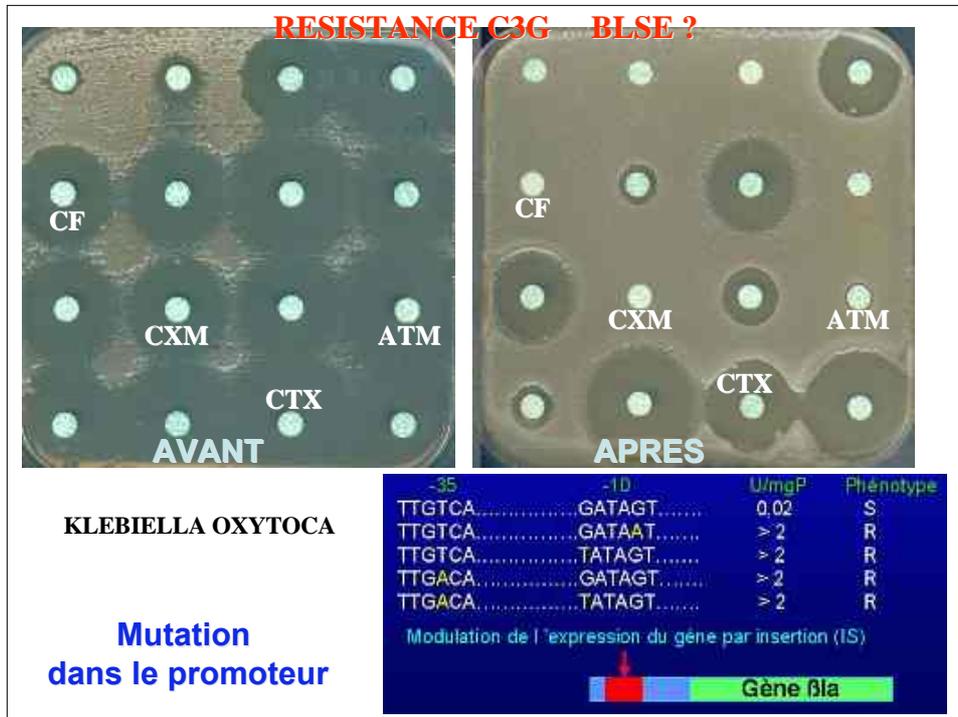


β-Lactamase	Alternate Name	Amino acid at position	Phenotype																			
			6	16	21	28	34	36	38	39	40	42	49	51	64	69	80	84	92	100	102	104
TEM-1	RTEM-1	2b	Q	F	L	E	K	D	D	Q	L	A	L	L	E	M	V	V	G	N	L	E
TEM-2		2b								K												
TEM-3	CTX-1 TEM-14	2be								K												K
TEM-4		2be			F																	K
TEM-5	CAZ-1	2be																				K
TEM-6		2be																				K
TEM-7		2be								K												K
TEM-8	CAZ-2	2be								K												K
TEM-9	RHH-1	2be			F																	K

<http://www.lahey.org/Studies/>

K. PNEUMONIAE : EVOLUTION





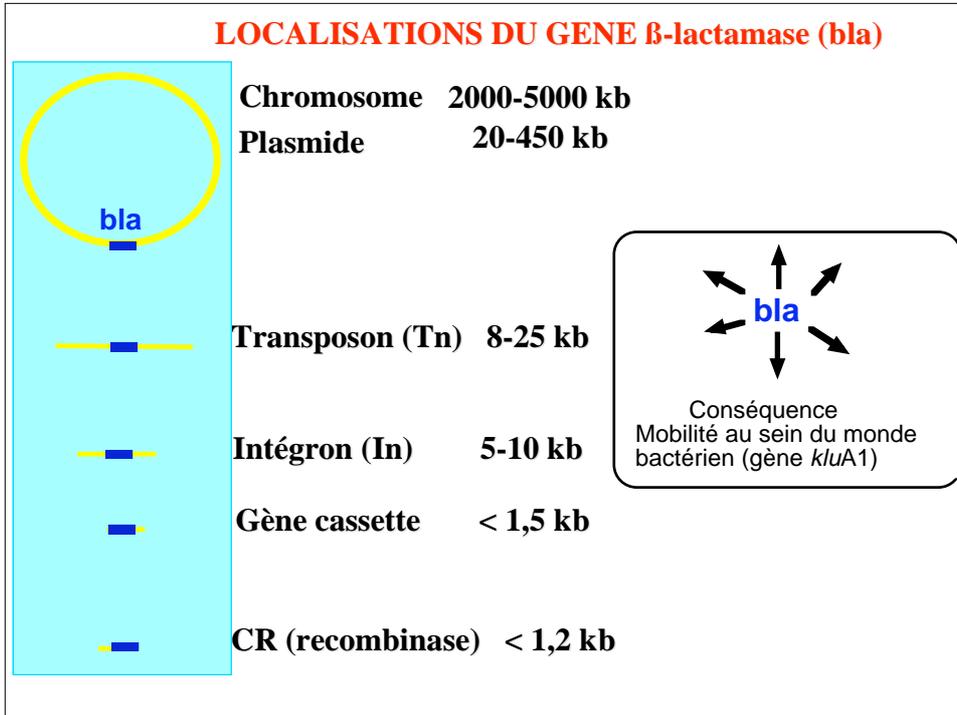
MECANISMES GENETIQUES : ACQUISITION DE GENES

Rappels: résistance extrachromosomique, plasmidique, transposable

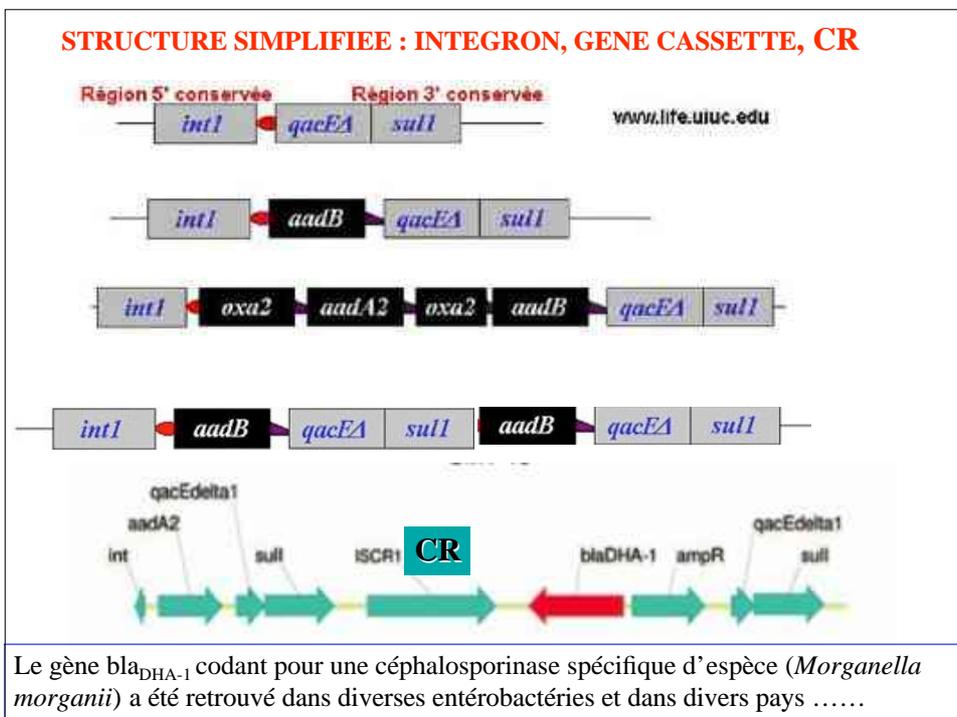
Plusieurs modes de transfert : transformation¹, conjugaison², transduction³

- . Transfert d'un/plusieurs gènes de résistance
- . D'une espèce bactérienne à l'autre : E. coli - K.pneumoniae - P. aeruginosa
- . Insertion chromosome ou non, puis excision
- . ADN: Chromosome, Plasmide, Intégron, Gène cassette, CR (Common Region)

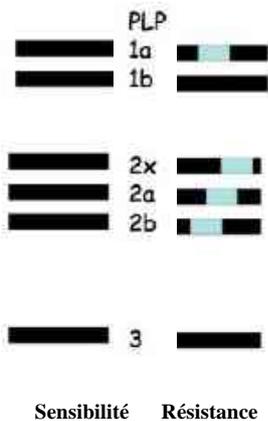
LOCALISATIONS DU GENE β -lactamase (bla)



STRUCTURE SIMPLIFIEE : INTEGRON, GENE CASSETTE, CR



MECANISMES GENETIQUES: ASSOCIATION



Finalement dissémination de souches résistantes

CONCLUSIONS

- . **Diversité étonnante** des mécanismes de résistance, en particulier acquis
- . **Problème de santé publique** à l'échelle planétaire
- . **Identification précise** a permis d'imaginer de nouveaux antibiotiques (hémi-synthèse, inhibiteurs enzymatiques)
- . **Caractérisation plus aisée** par PCR, voir séquençage: intérêt épidémiologique
- . **Approche phénotypique** en pratique médicale :
 - 1 AB détecte pour un autre (OXA, NAL), lecture interprétative
- . Comités d'experts valident des règles d'expertise : EUCAST, CLSI
- . **Systèmes experts commerciaux** (Plus de 1500 règles)

<http://www.microbe-edu.org/>

<http://www.ibacterionet.org/>

Entérobactéries

Variations des phénotypes de résistance naturelle

Banque

Entérobactéries	Bacilles aérobies stricts
Citrobacter freundii	Acinetobacter baumannii
Citrobacter koseri	Acinetobacter lwoffii
Citrobacter sedlakii	Alcaligenes faecalis
Enterobacter cloacae	Achromobacter xyloxydans
Enterobacter aerogenes	Bordetella bronchiseptica
Escherichia coli	Burkholderia cepacia
Escherichia hermannii	Burkholderia pseudomallei
Hafnia alvei	Chryseobacterium indologenes
Klebsiella oxytoca	Chryseobacterium meningosepticum
Klebsiella pneumoniae	Myroides odoratus
Kluyvera ascorbata	Ochrobactrum anthropi
Kluyvera georgiana	
Kluyvera cryocrescens	
Morganella morganii	
Providencia stuartii	

www.microbes-edu.org

Remerciements

A tous les collègues français ou étrangers qui mettent leurs présentations en ligne ainsi qu'à Google® qui nous permet de les retrouver très facilement.
Nous leur avons emprunté certaines illustrations.
Qu'ils en soient vivement remerciés.