

Mécanismes de défense des microbes : antibiorésistance, LE défi

Prof. Philippe Sansonetti

AMX

TIC

PIP

FEP

CF

AMC

CAZ

TPZ

FOX

CXM

TCC

ATM

MEC

Leçon # 2

Collège de France

09 décembre 2015



COLLÈGE
DE FRANCE
— 1530 —



INSTITUT PASTEUR

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Une brève histoire de l'ère des antibiotiques

Découverte des premiers antibiotiques = succès fulgurants

Utilisation AB + asepsie chirurgicale + généralisation des vaccins + hygiène (en particulier alimentaire) ont fait croire à la possibilité de disparition des maladies infectieuses

Traitement des infections bactériennes mortelles:

- Aiguës = infections néonatales, pneumonies, septicémies/méningites, pyélonéphrites, angines/phlegmons, cellulites
- Lentes/chroniques: Tuberculose, endocardites, RAA

Ont permis les grandes avancées de la médecine moderne:

Traitement des leucémies et cancers, greffe médullaire, greffe d'organes

A la fin des années 60, William H. Stewart, « Surgeon General » des Etats Unis déclarait : « le moment est venu de fermer le livre des maladies infectieuses et de déclarer gagnée la guerre contre les pestilences »...

Une brève histoire des antibiotiques

Sérieux doutes sur fermeture du livre.

Extension de l'antibiorésistance et difficulté croissante à traiter certaines infections bactériennes (surtout Gram -) et fongiques

Crise de l'antibiorésistance universelle, causes complexes et réponses complexes:

- Recherche en innovation thérapeutique (course aux armements, limites...)
- Rationalisation, contrôle accru de l'utilisation des antibiotiques
- **Connaissance de l'écologie et des mécanismes de l'émergence et de la transmission de la résistance (réponses innovantes possibles...)**

Contrôle de la résistance aux antibiotique = LE défi de la médecine humaine et vétérinaire.

Echec = perte d'un des outils les plus efficaces de la médecine



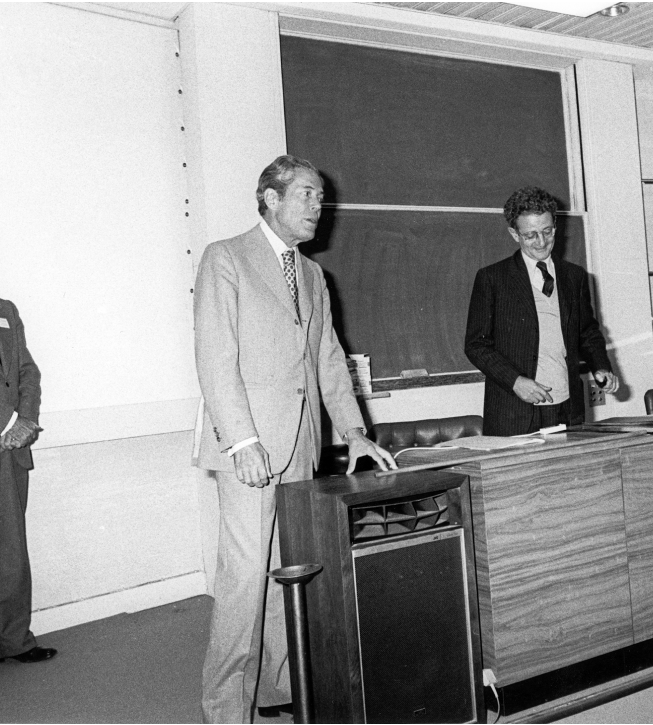
Antibiotiques: une courte parenthèse dans le contrôle des maladies infectieuses ? "De Semmelweis à Semmelweis ?"

Mortalité annuelle dans l'Union Européenne due à des infections à bactéries multirésistantes (ECDC/EMA Working Group, 2009): 25 000 patients (USA = 63 000)



Foreword

Antimicrobial resistance (AMR) within a wide range of infectious agents is a growing public health threat of broad concern to countries and multiple sectors. Increasingly, governments around the world are beginning to pay attention to a problem so serious that it threatens the achievements of modern medicine. A post-antibiotic era—in which common infections and minor injuries can kill—far from being an apocalyptic fantasy, is instead a very real possibility for the 21st century.



Jacques Monod
Yves-Achille
Chabbert



Stanley Falkow

Mes débuts....

Institut Pasteur 1975

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Mar. 1980, p. 327-333
0066-4804/80/03-0327/07\$02.00/0

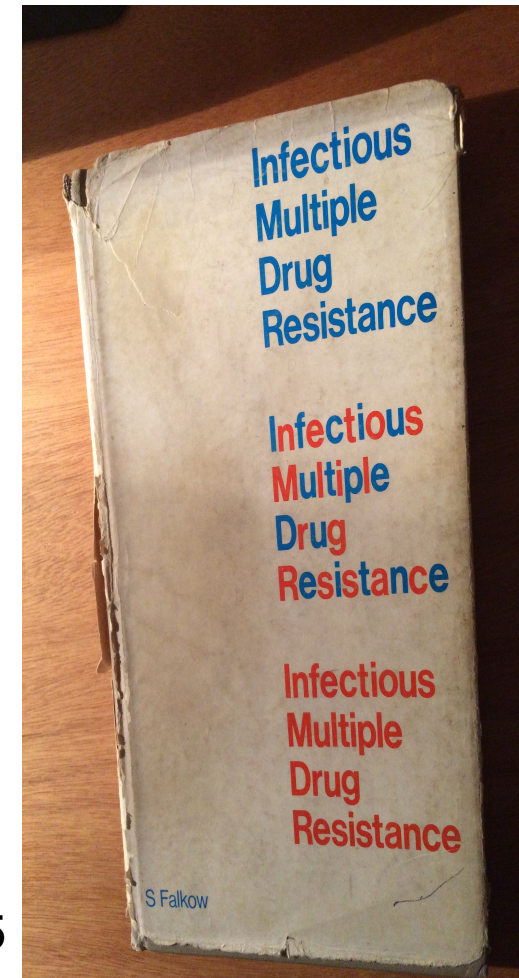
Vol. 17, No. 3

Parameters Controlling Interbacterial Plasmid Spreading in a Gnotoxenic Chicken Gut System: Influence of Plasmid and Bacterial Mutations

PHILIPPE SANSONETTI,¹ JEAN-PIERRE LAFONT,^{2*} ALINE JAFFÉ-BRACHET,¹
JEAN-FRANÇOIS GUILLOT,² AND ELISABETH CHASLUS-DANCLA²

Institut Pasteur, Service de Bactériologie Médicale, 75015 Paris,¹ and Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Tours, Station de Pathologie Aviaire, Nouzilly 37380 Monnaie,² France

1975



Définitions

Antibiotique = substance capable de tuer les bactéries (bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (bactériostatique)

Les mécanismes d'antibiorésistance peuvent être définis comme INTRINSEQUES ou EXTRINSEQUES.

Résistance intrinsèque:

Propriétés naturelles assurant la survie d'un organisme adapté à son environnement naturel

Surtout diminution des capacités d'import de molécules toxiques diverses qui ne peuvent atteindre leur cible

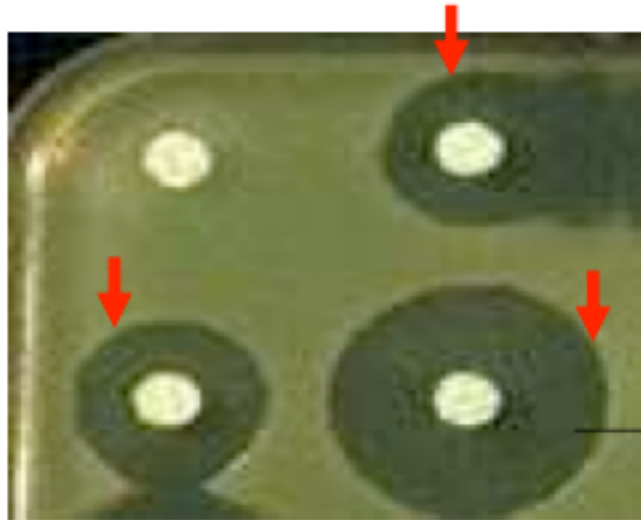
Résistance extrinsèque:

- Mutations dans une cible naturellement sensible ou accentuant les mécanismes naturels d'efflux

- Acquisition par transfert horizontal d'éléments mobiles (intégrons, transposons, plasmides) portant des gènes/opérons assurant la dégradation/inactivation de l'antibiotique ou l'inactivation de sa cible ou l'expression de pompes à efflux

Evaluation de la sensibilité/résistance aux antibiotiques

Concentration Minimale Inhibitrice



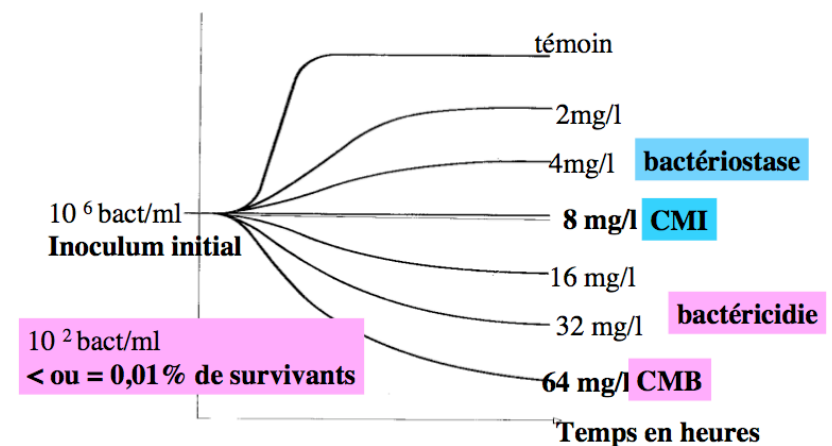
Antibiogramme

Concentration d'antibiotique inhibant toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 h de culture à 37°C

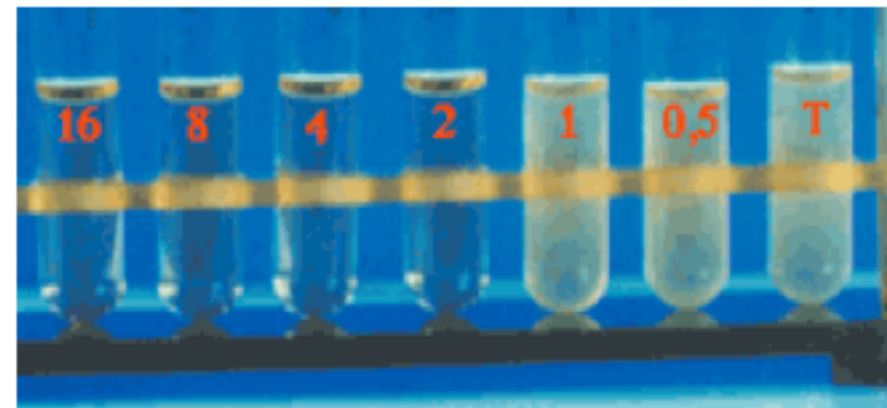
La CMI caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique

CMI

Nombre de bactéries/ml



Concentration minimale bactéricide



La plus petite concentration d'antibiotique laissant subsister 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 h de culture à 37°C.

La CMB caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique

CMB

Résistance aux antibiotiques: ça ne date pas d'hier...

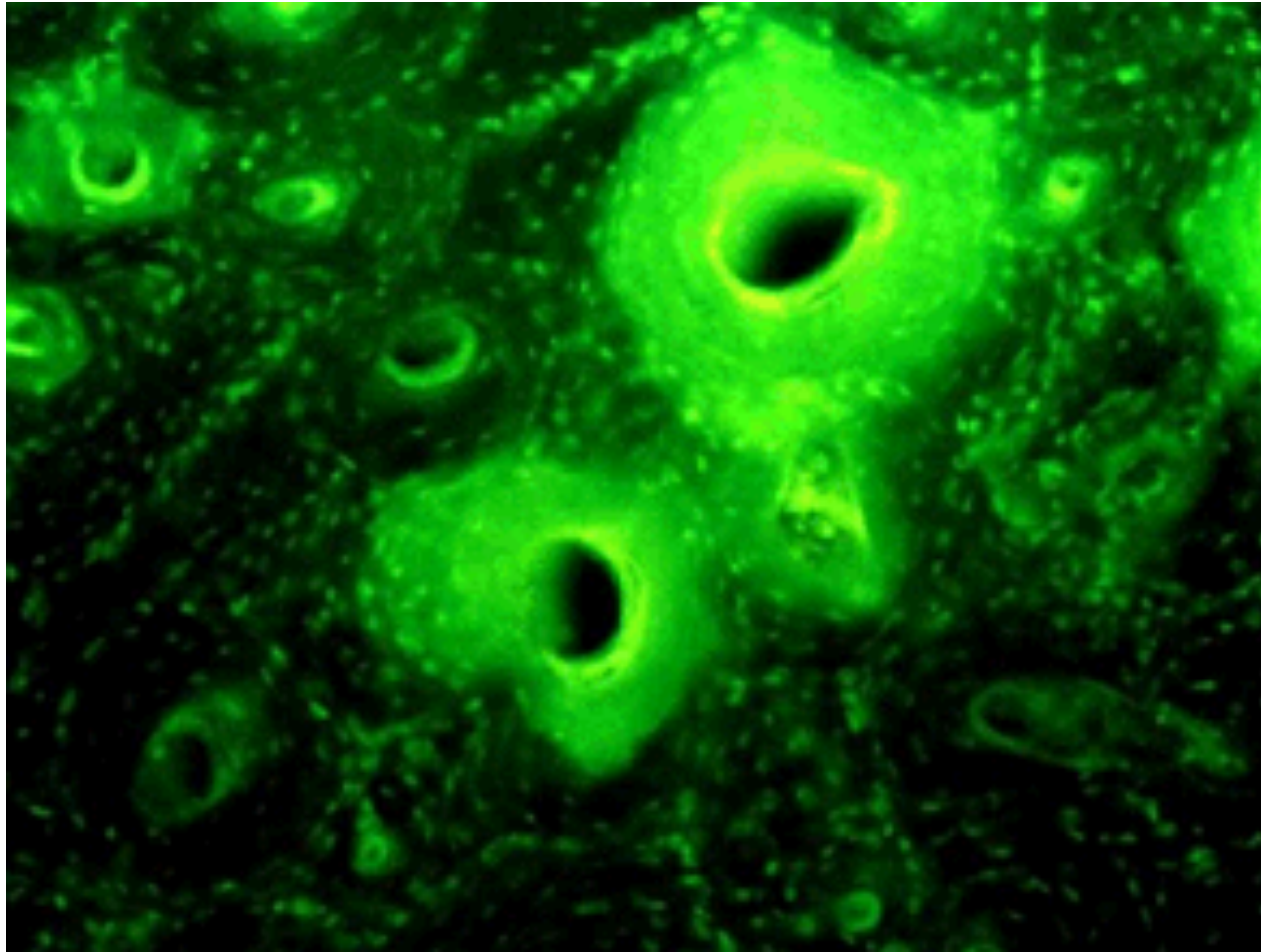
Antibiotiques et résistance existaient avant les antibiotiques modernes

Potentiel de résistance ne se réduit pas à l'hôpital, le "résistome" est global et ancien

Il est humain (hospitalier & communautaire), vétérinaire et environnemental

"One world-one health"

Antibiotiques et résistance à l'ère préantibiotique: un peu d'"archéomicrobiologie"



Autofluorescence osseuse due à l'accumulation de tétracycline

Antibiotiques à l'ère préantibiotique: un peu d'"archéomicrobiologie"

Traces de Tétracycline dans des squelettes humaine en Nubie, Oasis de Dakleh, Soudan, - 550-350 (Bassett & coll, 1980; Nelson & coll, 2010)

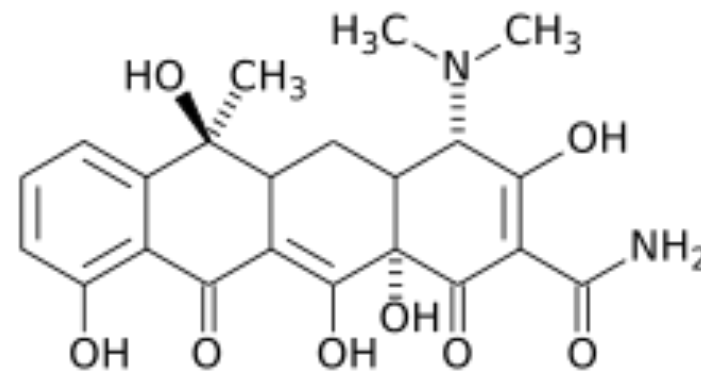
Tétracycline = tropisme pour l'hydroxyapatite de l'os et de l'émail dentaire

Chélation = protection

Seul antibiotique, les autres familles se fixant sur des cibles moléculaires biodégradables (Acides nucléiques, protéines)

Présence très probable de la tétracycline dans l'alimentation de ces populations. Boissons fermentées Actinomycètes)

Protection contre les infections ? Peu d'évidence d'infections (osseuses) dans ces populations (Cook & coll, 1989)



Tétracycline

Antibiorésistance à l'ère préantibiotique: un peu d'archéomicrobiologie

Histoire naturelle des gènes de résistance aux antibiotiques retracée par la construction d'arbres phylogéniques bactériens Révèle la présence ancienne de gènes de résistance dans des espèces bactériennes, bien avant l'ère des antibiotiques (Aminov & Mackie, 2007; Kobayashi & coll, 2007)

Arbres phylogéniques et "phylogénie structurale" montrent que les sérine- et les métallo-beta-lactamases remontent à deux milliards d'années, certains des gènes étant localisés sur des plasmides présents depuis des millions d'années (Hall & Barlow, 2004; Garlow & coll, 2005)

La beta-lactamase et les gènes de ménage sont totalement congruents chez *Klebsiella oxytoca*, indiquant sa présence depuis au moins l'apparition de l'espèce il y a 100 millions d'années.

Antibiotiques et résistance aux antibiotiques: longue co-évolution, récente accélération

La présence d'antibiotiques et la présence de gènes conférant contre eux une résistance est une expression darwinienne de la sélection naturelle dans le monde microbien

Le rôle majeur de la production d'antibiotiques par un microorganisme dans les environnements naturels est de permettre la colonisation d'une niche ou la survie dans un univers polymicrobien complexe

La résistance peut ainsi être vue comme une réponse sélective à cette production par les bactéries productrices elles mêmes ou leurs bactéries cibles

Exacerbation par introduction massive d'antibiotiques "exogènes" dans l'environnement au milieu du 20^{ème} siècle

Consommation planétaire annuelle d'antibiotiques

600 Tonnes chez l'homme

1300 Tonnes chez l'animal

One world, one health...

Pression sélective globale massive !
Antibiotiques vus comme des
polluants environnementaux...

Antibiotiques et résistance à l'ère préantibiotique: un peu d'"archéomicrobiologie"

Importante fraction des antibiotiques produite par des bactéries de l'environnement, les gènes de résistance pourraient être issus de ces mêmes bactéries qu'ils protégeraient des antibiotiques qu'elles produisent (Benveniste & Davies, 1973)

Bacillus circulans-Butirosine-aminoglycosidephosphotransférase-*Escherichia coli*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 74, No. 3, pp. 999-1003, March 1977
Biochemistry

Aminoglycoside-modifying enzyme of an antibiotic-producing bacterium acts as a determinant of antibiotic resistance in *Escherichia coli*

(neomycin phosphotransferase/*Bacillus circulans*/recombination *in vitro*/origin of R-plasmids)

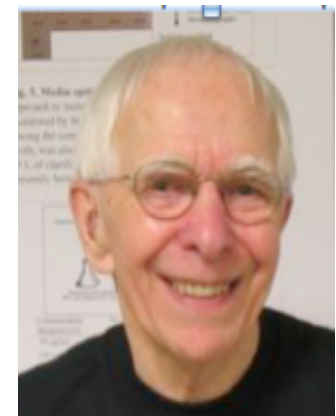
PATRICE COURVALIN*, BERNARD WEISBLUM†, AND JULIAN DAVIES*

* Department of Biochemistry, College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wis. 53706; and † Department of Pharmacology, University of Wisconsin Medical School, Madison, Wis. 53706

Communicated by James F. Crow, January 6, 1977

ABSTRACT *Bacillus circulans* NRRL B-3312, a nonpathogenic bacterium that produces the aminoglycoside antibiotic

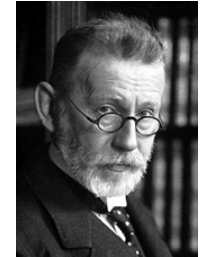
Bacillus circulans NRRL B-3312 is used for the production of butirosin, an antibiotic closely related to neomycin. This



Julian Davies

Fondation de l'antibiothérapie moderne

Paul Ehrlich
1854-1915
Prix Nobel, 1908
(E Metchnikov)



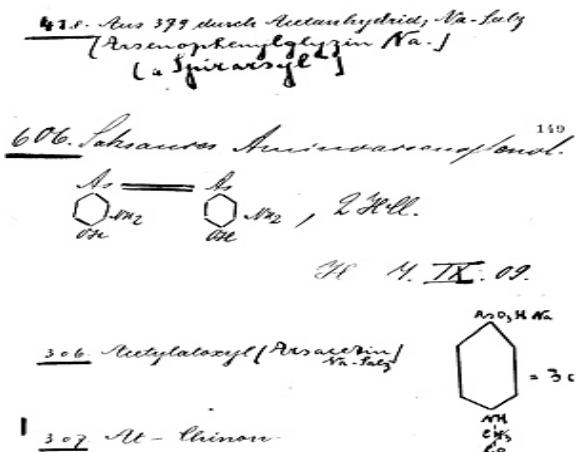
Une molécule doit spécifiquement cibler un pathogène dans de plus vastes populations microbiennes (Aniline colore sélectivement certaines bactéries).

1904: début d'un programme à grande échelle de synthèse de molécules et de criblage dans le traitement de la **syphilis** expérimentale du lapin

Treponema pallidum traité par sels de mercure: faible efficacité et forte toxicité
Synthèse de centaines de molécules dérivées de l'Atoxyl, organoarsenic très toxique.

1907, Paul Ehrlich, Alfred Bertheim et Sahachiro Hata, testent 6 molécules de la 600^{ème} série qui s'avèrent efficace (606 = Novarsenobenzol/Salvarsan).
Beaucoup d'injections, toxicité résiduelle. Collaboration avec Hoechst ,
Neosalvarsan plus soluble, moins toxique (Ehrlich & Hata, 1910)

En combinant synthèse et criblage, Paul Ehrlich a inventé la chimie médicinale moderne !



Les successeurs d'Ehrlich, Les sulfamides

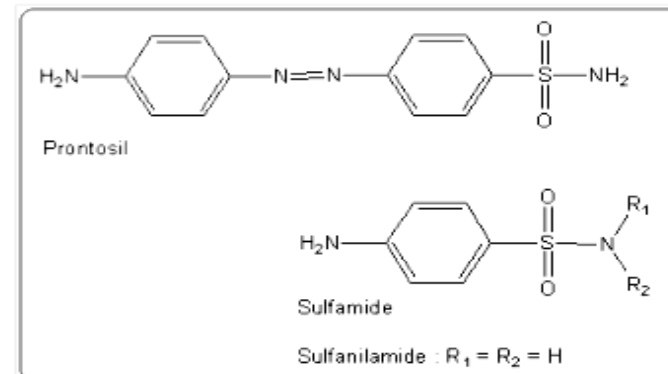
Gerhard Domagk
1895-1964
Prix Nobel, 1939



1935: **Sufonamidochrysoïdine (Prontosil)**. Proche des AB actuels
Fritz Mietzsch et Josef Klarer, puis **Gerhard Domack**, chimistes chez Bayer.
Montre un large spectre d'activité: pneumonie et méningite, fièvre puerpérale !
Prodrogue, dérivé actif – Sulfanilamide - ne put être breveté (antériorité
de ces molécules comme colorants...)
Utilisation immédiatement très large...
Apparition rapide de la sulfarésistance (portée par un intégron de type 1)
Confère un avantage sélectif aux bactéries l'hébergeant (Enne & coll, 2004)
Nombreux dérivés, seuls ou en association
(sulfaméthoxazole-triméthoprimine)

L'aventure des sulfamides.

BOVET (Daniel) : Une chimie qui guérit. Histoire de la découverte des sulfamides. — Paris, Payot, 1988, in-8°, 323 p. (« Médecine et Sociétés Payot »). — 198 F. →



Controverse: p-aminophénylsulfamide (principe actif du Prontosil) découvert dans le laboratoire de Ernest Fourneau à l'Institut Pasteur: Daniel Bovet, Jacques et Thérèse Tréfouël, Federico Nitti



Picasso, 1897
La science et la charité
Musée Picasso, Barcelone

Des composés synthétique aux composés naturels: la Pénicilline

Prix Nobel, 1945



Sir Alexander Fleming
(1881-1955)



Ernst Boris Chain
(1906-1979)



Sir Howard Walter Florey
(1898-1968)

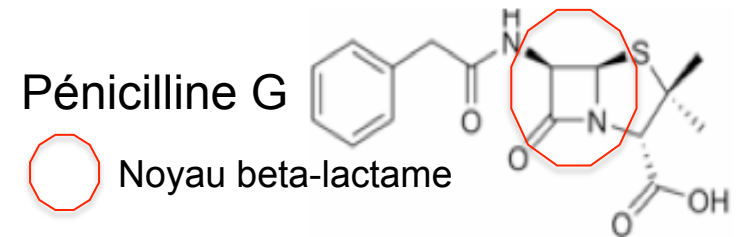
1929: Alexander Fleming, la Pénicilline.

On savait que des mousses (*Penicillium*) avaient des propriétés antibactériennes, mais personne n'avait comme AF, à partir de son observation initiale, montré une telle obstination à purifier et stabiliser la molécule active.

Au passage, il mit au point une méthode de criblage d'activité par apparition d'une zone d'inhibition sur gélose universellement reprise = **antibiogramme**.

Intervention de Howard Florey et Ernest Chain (chimistes d'Oxford), pour que la molécule soit purifiée, stabilisée et produite en quantité suffisante pour procéder en 1943 au premier essai clinique

(Mahoney & coll, 1943)

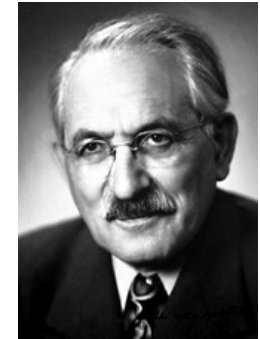


Production en masse dès 1945

Sulfamides et pénicilline, l'antibiothérapie moderne était née

Mais AF alertait déjà sur la nécessité d'utiliser le médicament à dose et durée suffisante afin d'éviter la survenue de résistances...

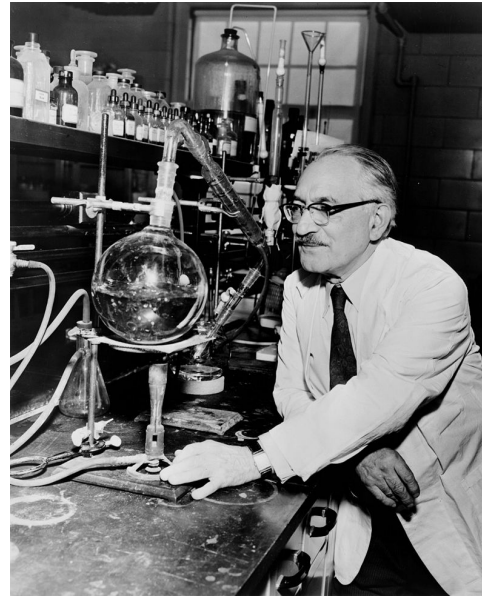
Streptomycine: premier antibiotique actif contre la tuberculose



1888-1973

Prix Nobel, 1952

"For his discovery of Streptomycin, the first antibiotic effective against Tuberculosis"

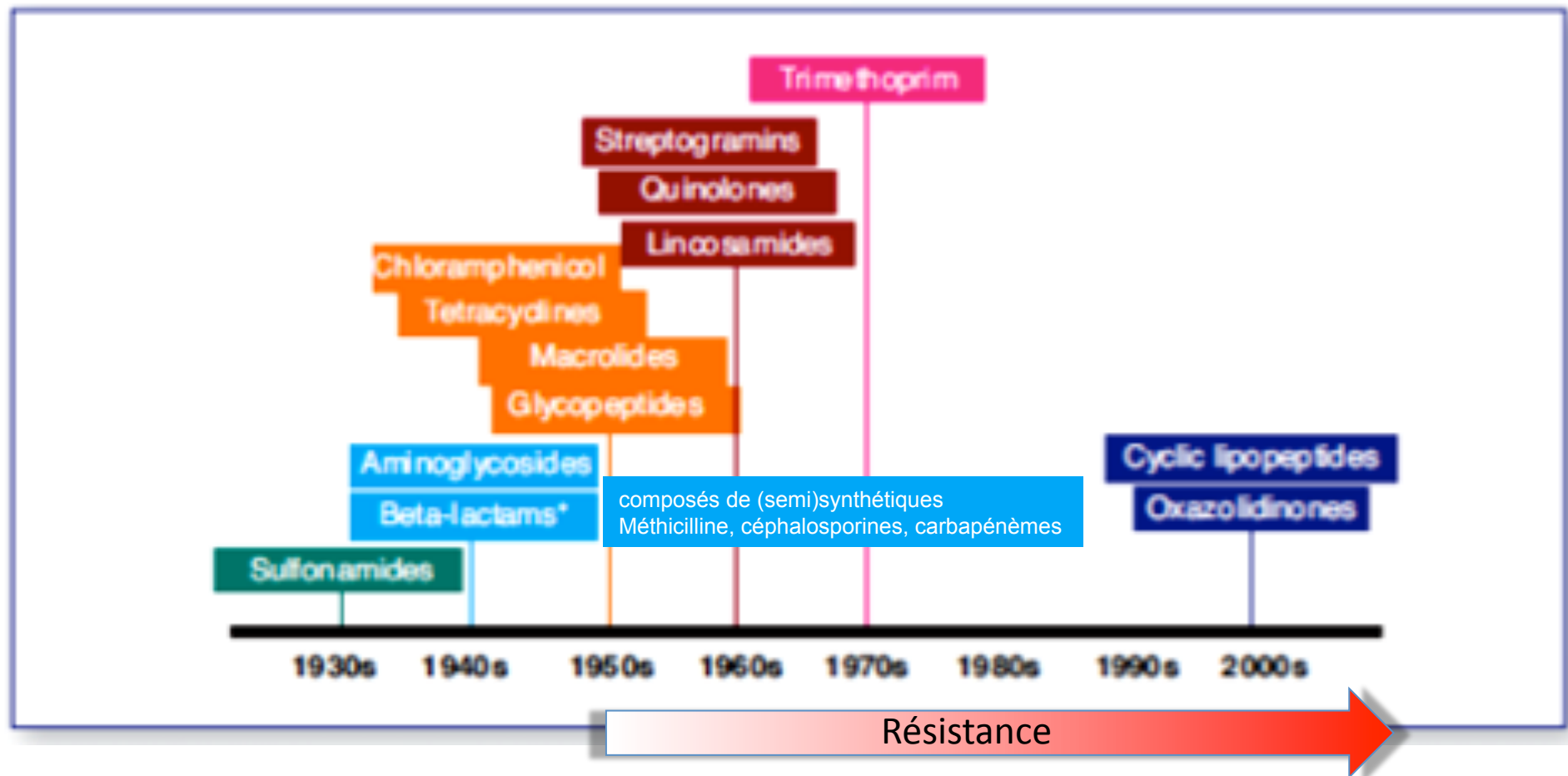


Waksman SA & Woodruff HB (1940) The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. J Bacteriol 40: 581–600

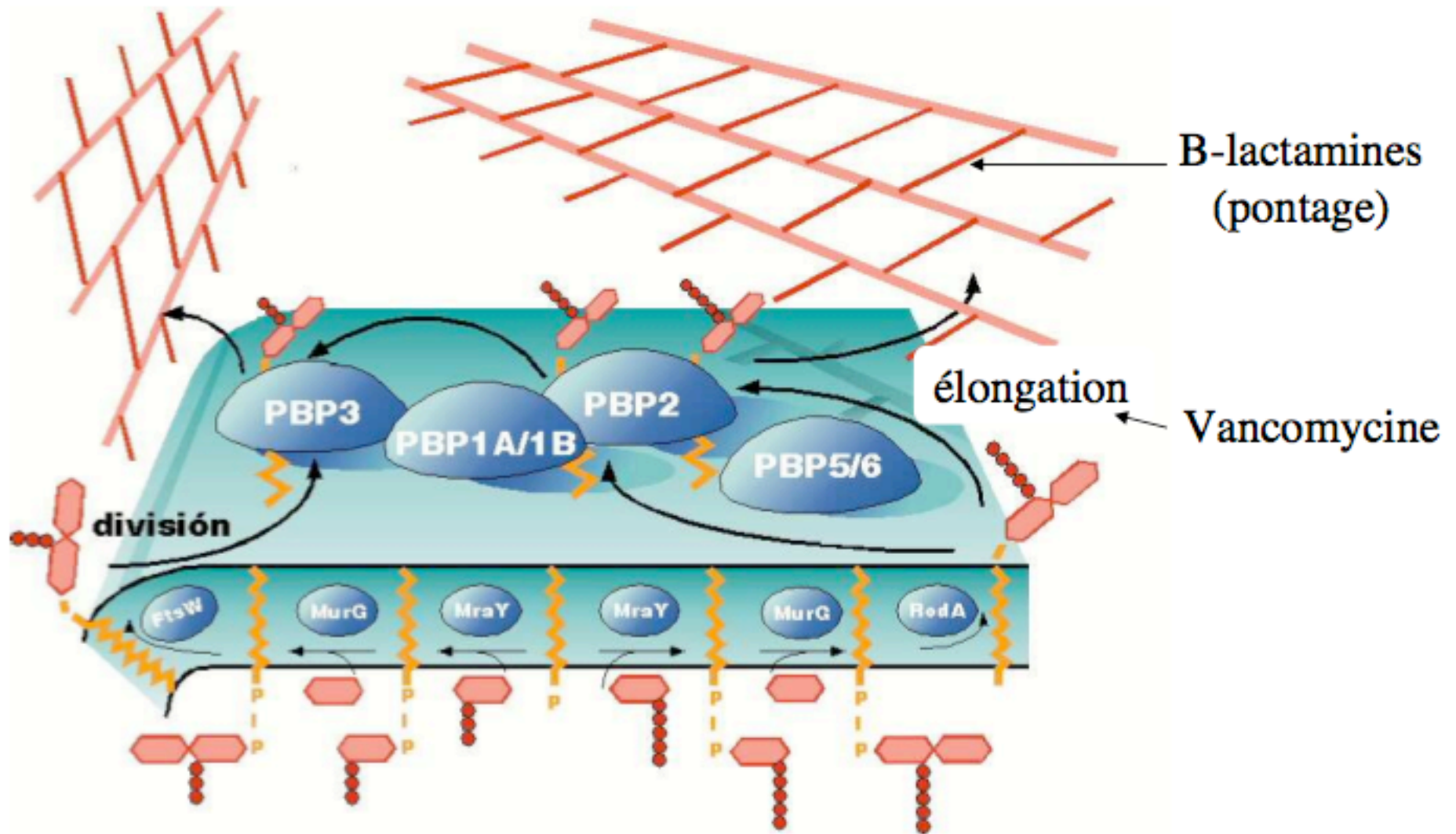
Selman Waksman: découverte de l'actinomycine (1940), de la Clavacine et Streptothricine (1942), de la **Streptomycine** (1943), de la Griséine (1946), de la Néomycine (1948), Fracidine, Candicidine, etc...

Années 40-60, "âge d'or" de l'antibiothérapie

Toutes les grandes familles d'antibiotiques furent découvertes ou confirmées dans cette période à l'exception des Lipopeptides cycliques et des Oxazolidinones



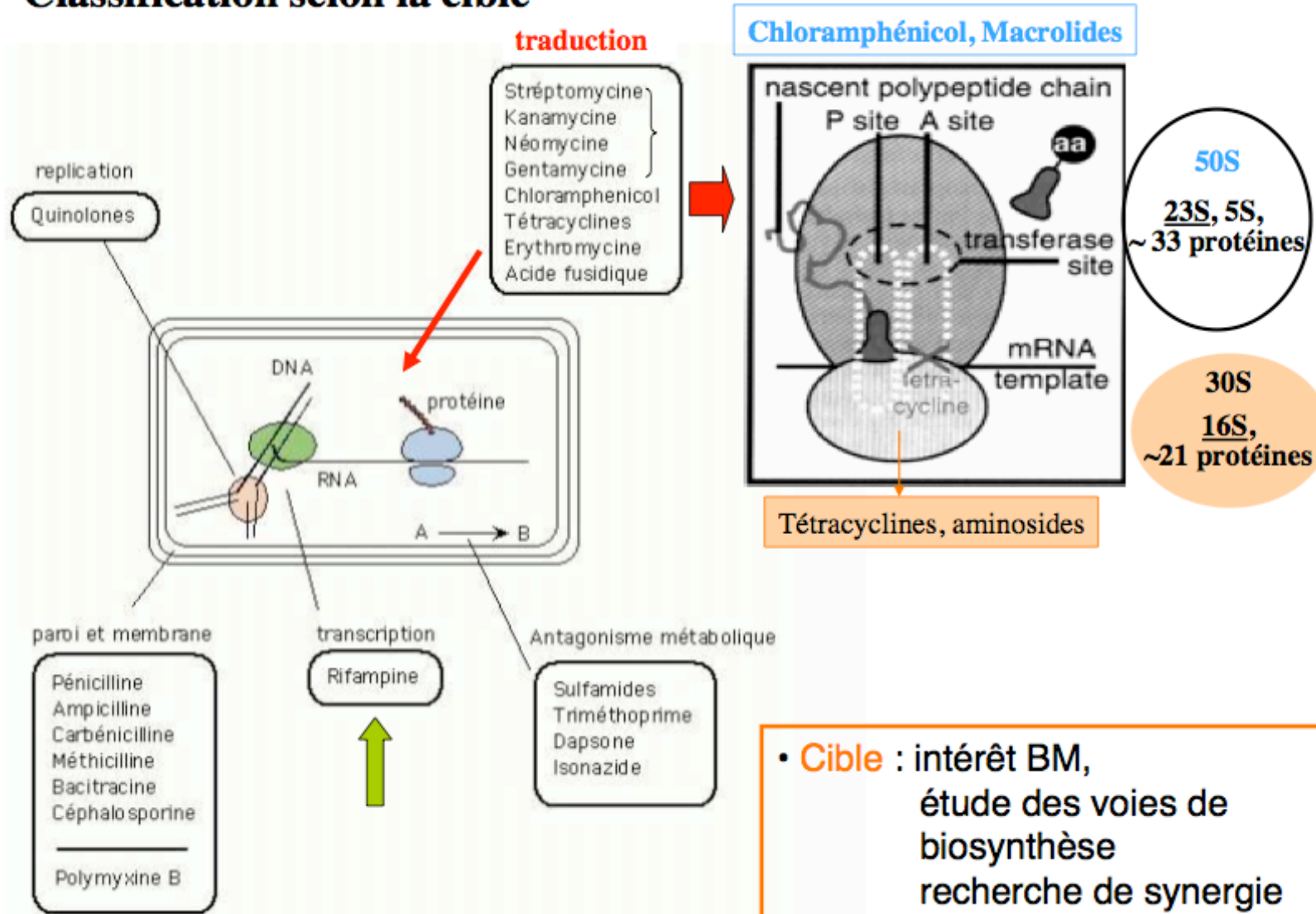
Mode d'action des antibiotiques: Biosynthèse de la paroi



Cytoplasme de la bactérie

Mode d'action des antibiotiques: Biosynthèse de la paroi

Classification selon la cible



• **Cible** : intérêt BM, étude des voies de biosynthèse recherche de synergie

Des débuts optimistes en dépit d'observations très précoces de dégradation de la pénicilline par certaines bactéries (Abraham & Chain, 1940)

“Syphilis has now been treated with arsenicals for about 40 years without any indications of an increased incidence of arsenic-resistant infections, and this work gives grounds for hoping that the widespread use of penicillin will equally not result in an increasing incidence of infections resistant to penicillin” (Rollo et al., 1952)

Affirmation tenait de l'exception plus que de la règle:
Excepté *Treponema pallidum*, *Streptococcus pyogenes* et *Neisseria meningitidis*, les entérobactéries et de nombreux pathogènes à Gram positif allaient devenir résistants à la pénicilline G, aux pénicillines semi-synthétiques, aux céphalosporines et carbapénèmes.

EPISOME-MEDIATED TRANSFER OF DRUG RESISTANCE IN ENTEROBACTERIACEAE

VII. TWO TYPES OF NATURALLY OCCURRING R FACTORS

TSUTOMU WATANABE, HIROSHI NISHIDA, CHIZUKO OGATA, TOSHIHIKO
 ARAI, AND SACHIKO SATO

Department of Microbiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Received for publication 25 March 1964

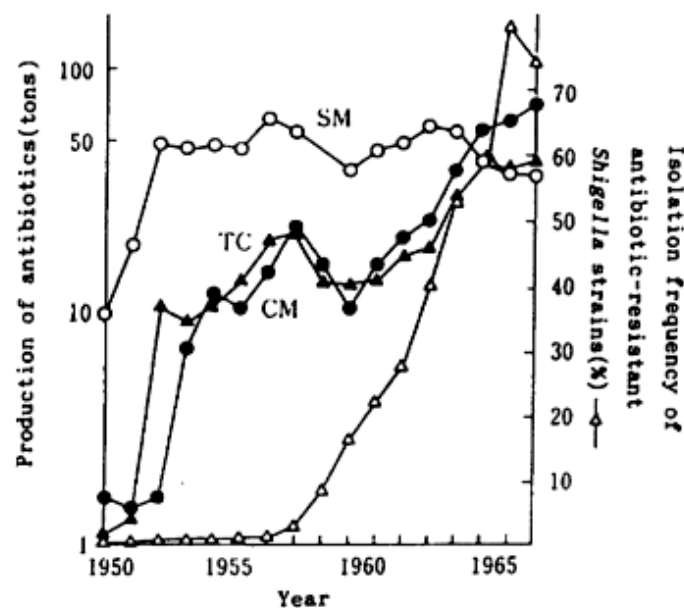


Fig. 1: Production of antibiotics and emergence of antibiotic-resistant bacteria. SM, streptomycin; TC, teracycline; CM, chloramphenicol.

- JACOB, F. 1960. Genetic control of viral functions. Harvey Lectures Ser. 55 (1958-1959), p. 1-39.
- JACOB, F., S. BRENNER, AND F. CUZIN. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-347.
- JACOB, F., P. SCHAEFFER, AND E. L. WOLLMAN. 1960. Episomic elements in bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 10:57-91.

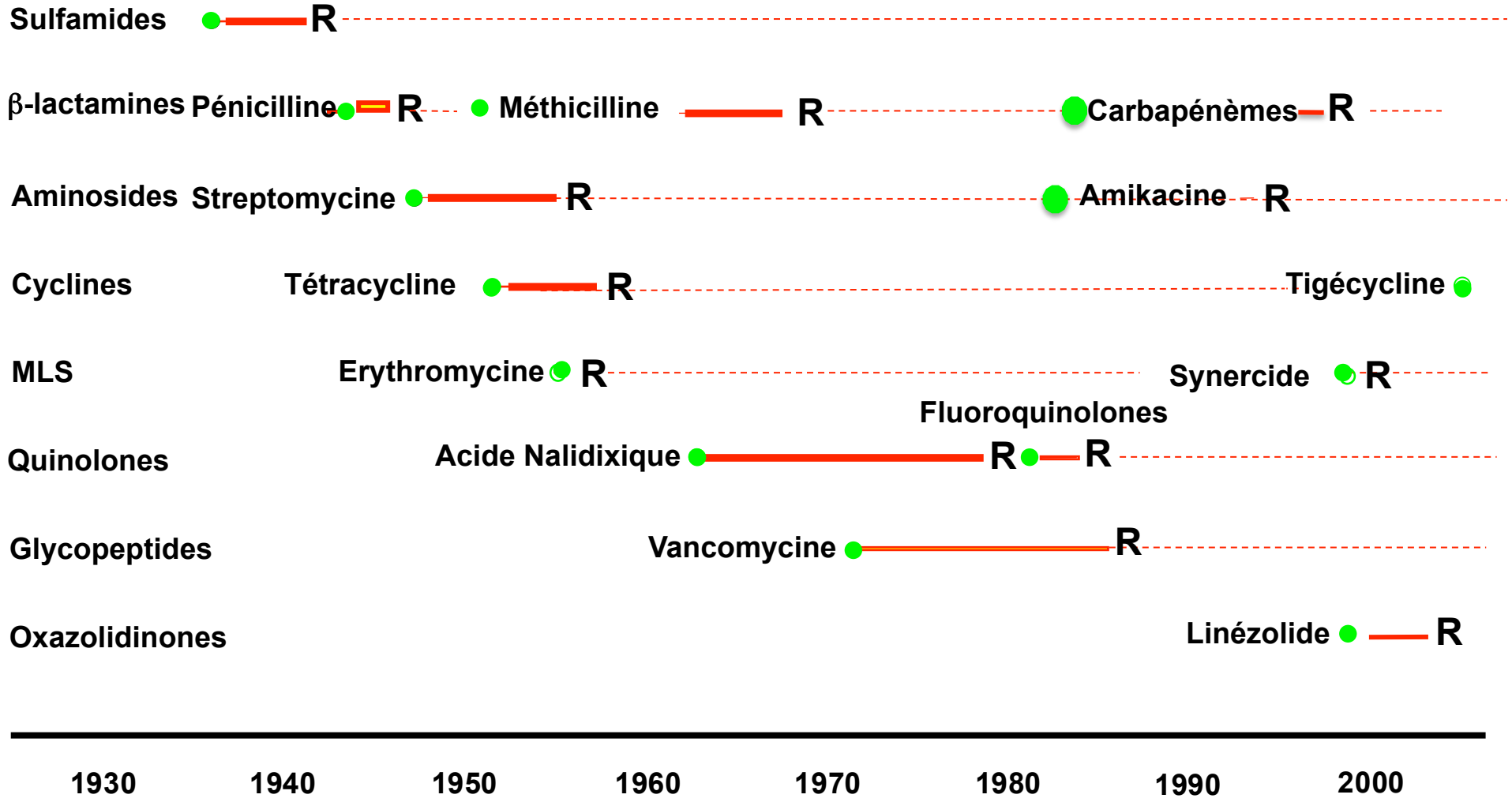
Table 4. Isolation frequency of antibiotic-resistant *Shigella* strains.

Year	1952	1955	1958	1961	1964	1968	1972	
No. of tested strains	3500	5327	6563	659	3588	1237	824	
No. of resistant strains:	3	5	240	143	1888	963	745	
Resistant strains (%):	0.08	0.09	3.6	21.6	52.6	77.8	90.4	
Triple*	TC-CM-SM	0	(1)	80	79	85	82.3	84
Double*	TC-SM	(1)	0	(1)	(1)	(1)	1.7	0.3
	CM-SM	0	0	(3)	(6)	(4)	15	8.5
	TC-CM	0	0	0	0	(1)	0	1.3
Single*	TC	(1)	0	(8)	(12)	(7)	0.5	0.7
	SM	(1)	(4)	(8)	(2)	(2)	0.5	2.4
	CM	0	0	0	0	0	0	2.4

* Number in parenthesis is the actual number of isolates. Otherwise, values indicate numbers of resistant strains. Antibiotic-resistant strains generally carry SA-resistance.

Antibiotiques et survenue de la résistance

- Introduction en clinique
- R Apparition de la résistance



Causes principales de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques

Utilisation suboptimale des agents antiinfectieux pour la prophylaxie et le traitement des infections

Hospitalisations prolongées, augmentation du nombre et de la durée des séjours en unités de soins intensifs

Comorbidités chez les malades hospitalisés et utilisation accrue de dispositifs invasifs (catheters, etc...)

Non respect ou inefficacité des pratiques de contrôle des infections dans les hôpitaux, transferts de malades colonisés d'hôpitaux à hôpitaux

Maintien/regroupement prolongé de patients colonisés au sein de structures médicales

Utilisation indiscriminée des antibiotiques dans l'agriculture et l'élevage

Références de bases sur les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques

En Anglais:

Basic reviews on antibiotic resistance

Levy & Marschall, 2004, Nat Med

White & coll, 2005, ASM Press, Washington DC

Martinez, 2014, Drug Disc Today

Blair & coll, 2015, Nature Rev Microbiol

En Français:

Les Antibiotiques. Lemarchand & Courvalin. 2008. La Recherche

Une histoire de la résistance aux antibiotiques. Michel-Briand Y. 2009

L'anatibiogramme. Courvalin P & Leclerc R. 2010

On envisagera néanmoins trois aspects exemplaires des mécanismes émergents récents de résistance: récents:

Beta-lactamases à spectre élargi et carbapénèmases chez les entérobactéries

Résistance à la Vancomycine chez les entérocoques

Pompes à efflux chez *Acinetobacter baumannii*

Résumé des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (1)

Protection de la cible de l'antibiotique:

- **Mutation rendant la bactérie insensible à l'antibiotique**

Mutations dans les PBP: résistance progressive aux BETA-LACTAMINES

Mutation dans la RNA polymérase, résistance à RIFAMPICINE

Mutations dans des protéines ribosomales, résistance à STREPTOMYCINE

- **Modification secondaire par une enzyme**

Modification composition ponts peptidiques PGN, résistance à VANCOMYCINE

Méthylation d'un résidu Adénine dans l'ARN ribosomal 23S rendant la souche insensible aux MACROLIDES

- Remplacement de la cible comme les protéines de protection du ribosome rendant la bactérie insensible aux TETRACYCLINES

- **Protection contre l'accès de l'antibiotique à sa cible:** pompes à efflux

- **Protection physique empêchant l'accès de l'antibiotique:** Production d'exopolysaccharide et ADN dans la matrice des biofilms et piégeant l'antibiotique qui ne peut atteindre sa cible

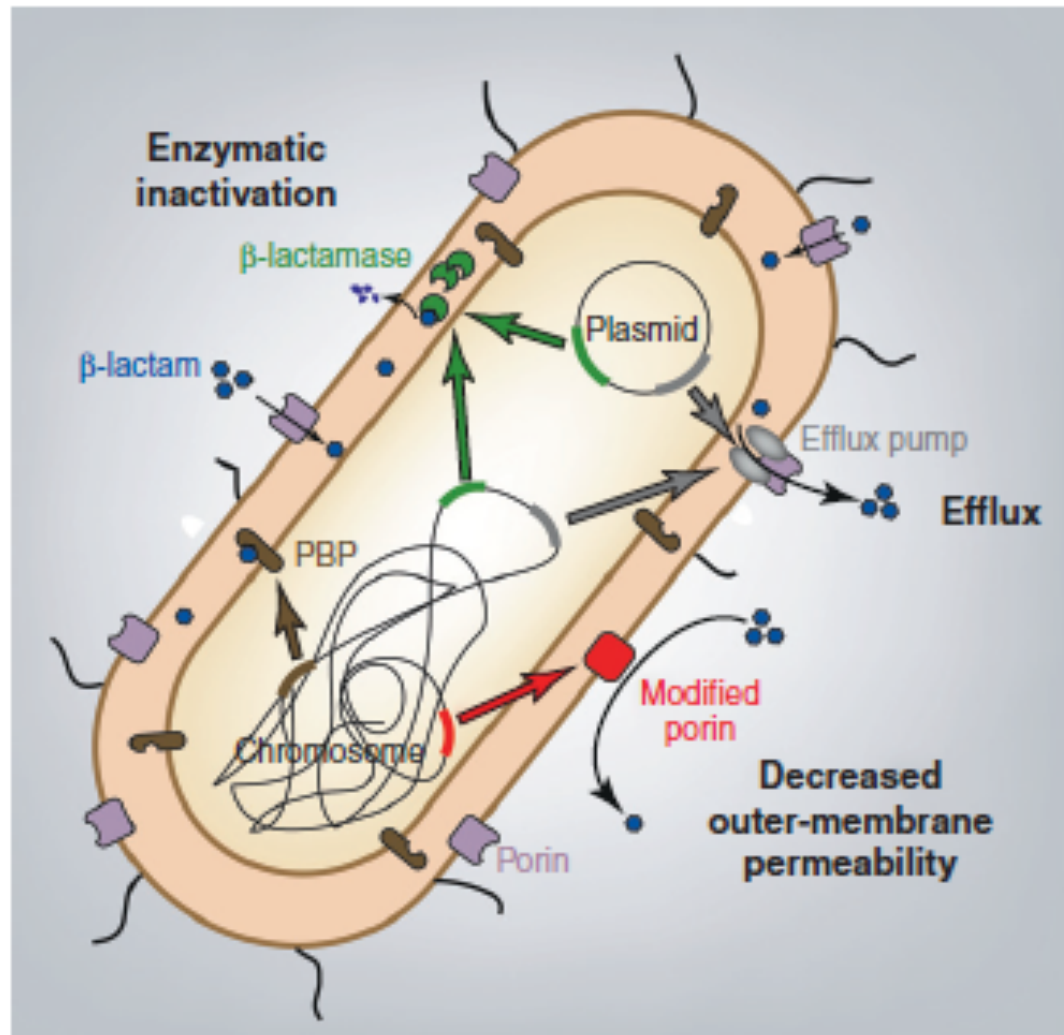
2 types = SPECTRE LARGE DE RESISTANCE

Résumé des mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (2)

Modification / destruction de l'antibiotique:

- Modification secondaire par une enzyme
Acétylation, phosphorylation des AMINOGLYCOSIDES
- Destruction par une enzyme hydrolytique
Destruction des BETA-LACTAMINES par les beta-lactamases

Synthèse des principaux mécanismes d'antibiorésistance



D'après Nordmann & coll

Causes de la capacité d'émergence et d'extension de la résistance des bactéries aux antibiotiques

Richesse du "résistome" = répertoire global de gènes potentiels de résistance aux antibiotiques

Efficacité de dissémination des vecteurs des gènes de résistance, plasticité génomique

Unicité du monde microbien: homme/animal/environnement

Amplification par l'augmentation des échanges nationaux et internationaux

Résistome

Ensemble des gènes de résistance à un ou plusieurs antibiotiques dans un "environnement" donné:

Isolat / clone bactérien émergent

Pangénome d'une espèce

Niche polymicrobienne (microbiome intestinal, lisier, etc...)

Ensemble des génomes de toutes les espèces séquencées !

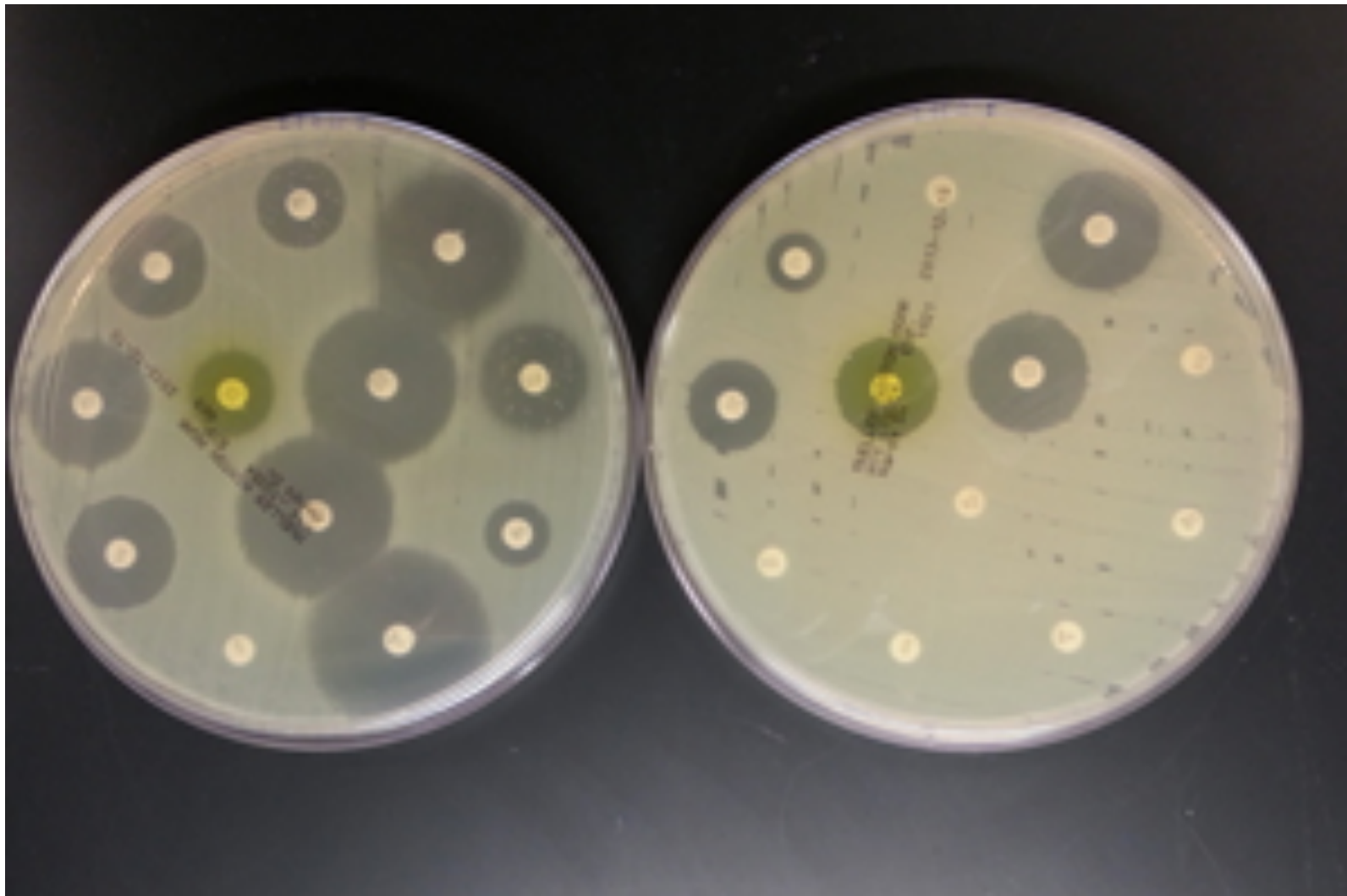
Identification du résistome variable selon l'"environnement"

- Séquençage / identification / fonction à l'échelle d'un microorganisme
- Métagénomique (éventuellement fonctionnelle) dans des environnements complexes

Escherichia coli (infection urinaire), souche globalement sensible (A), souche multirésistante (B)
Résistome d'un clone, notion de "superbug"

A

B



Résistome global

Base de données = annotation de l'ensemble des données de séquences de génomes bactériens disponibles = 20 000 gènes potentiels de résistance de 400 types différents

Tous ne sont pas fonctionnels ou ne codent que pour des molécules candidates, mais donnent une idée du "résistome" global potentiel
(Liu & Pop, 2009, Nucleic Acid Res)

Le transfert latéral de gènes (TLG) est à la base du réarrangement et de l'évolution des génomes chez les procaryotes.

L'étendue des réarrangements est considérable: 25 % du génome, dans certaines espèces, dérive de TLG sur de longues périodes évolutives
Evidences d'évolution à plus court terme chez certains pathogènes comme *E. coli* dont le pangénome atteint 20 000 gènes pour environ 3500 gènes pour un génome individuel (Touchon & coll, 2009, PLoS Genetics)

Résistance aux antibiotiques = exemple le plus clair d'évolution accélérée, mue par TLG sous pression sélective

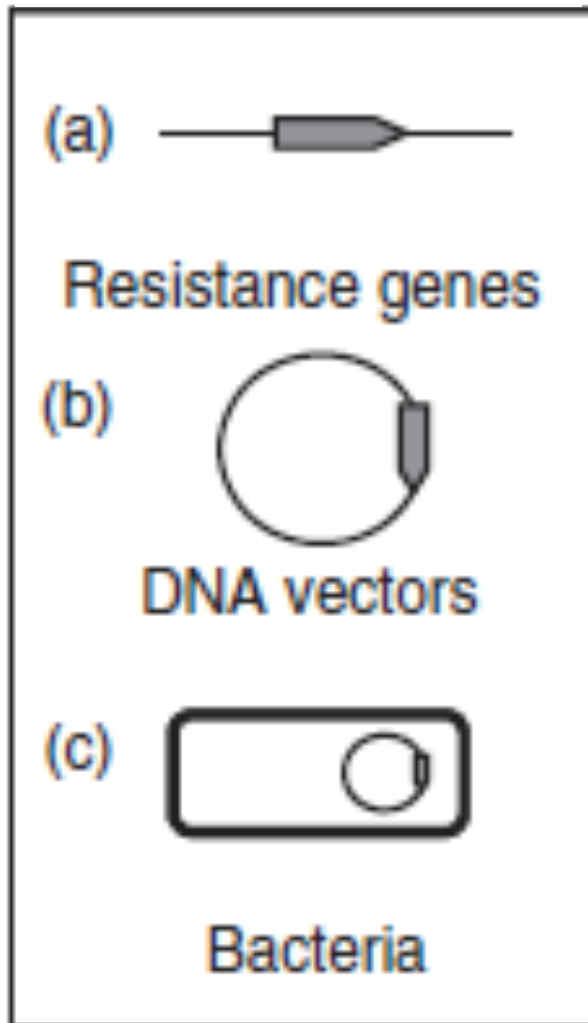
Les bactéries peuvent compter - grâce à l'énorme résistome existant - sur un potentiel constant d'évolution par un flux de gènes capables de passer les barrières phylogéniques (même Gram+/Gram-)

Différent de la sélections de polymorphismes générés par des évènements mutationnels rares chez les eucaryotes (excepté dans le système immunitaire)

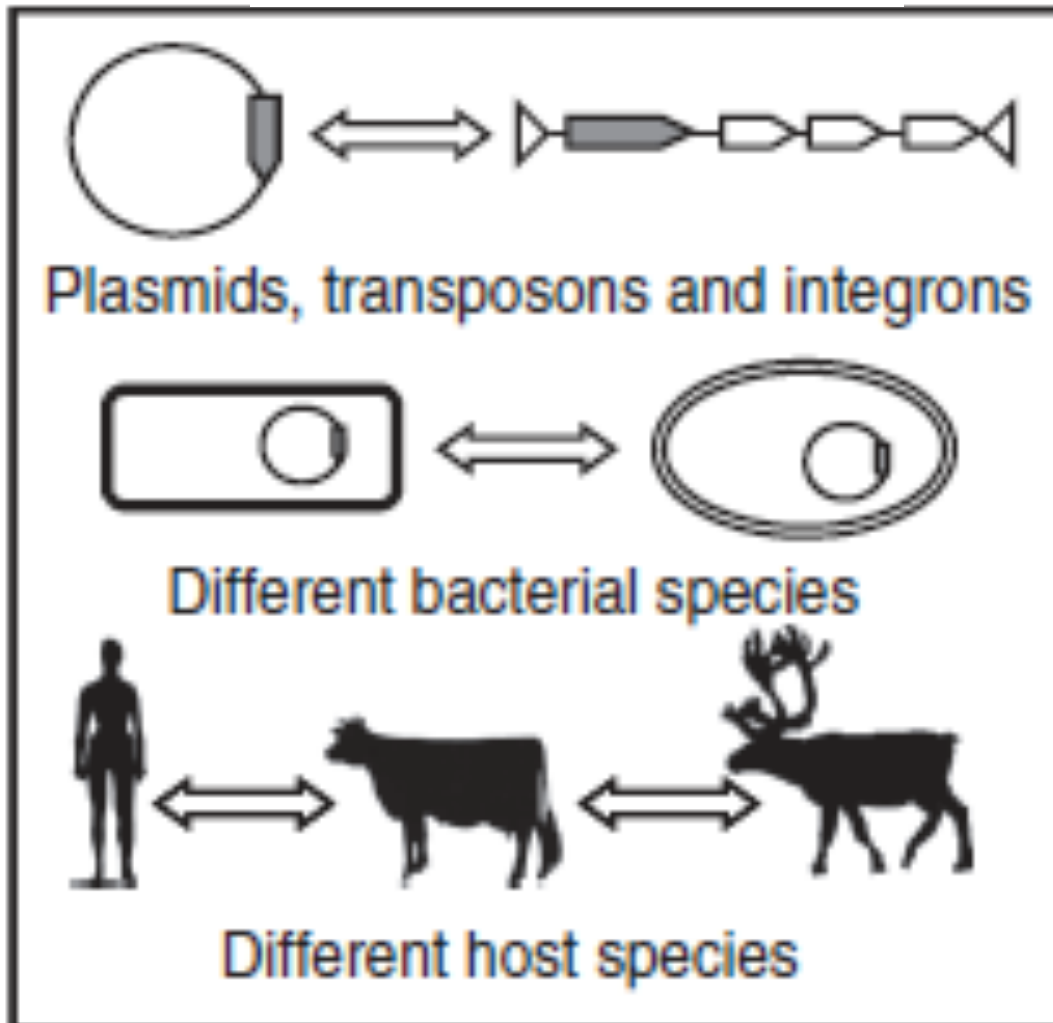
Ne veut pas dire que des mutations ponctuelles ne jouent pas un rôle, mais bien moindre

Différentes perspectives du mouvement et de la mobilisation de gènes assurant la résistance aux antibiotiques (Stokes & coll, 2011, FEMS Microbial Rev)

Unités de transfert



Vecteurs & receveurs

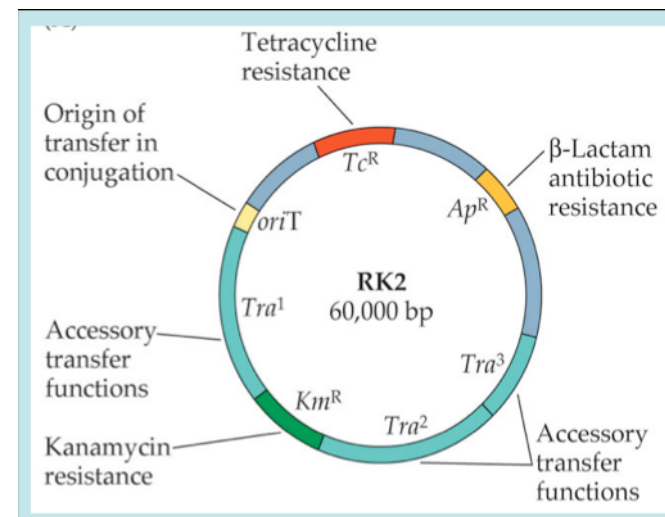
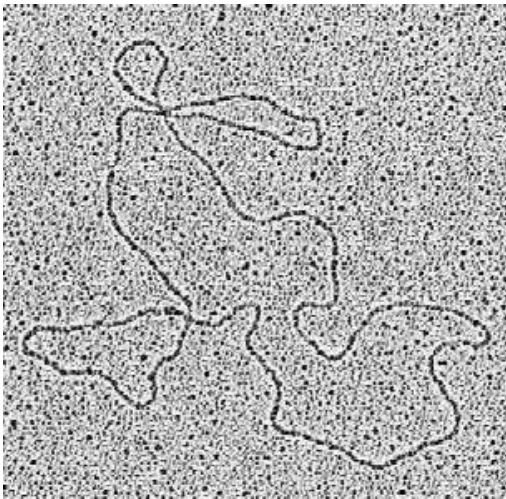


Vecteurs du transfert horizontal de gènes: **plasmides**

Plasmides: structures autoreplicatives, (le plus souvent) circulaires, extrachromosomiques, (souvent) autotransférables par conjugaison, de taille variable allant de quelques kilobases à plusieurs centaines de kilobases

Sans conteste le vecteur le plus efficace pour transmettre horizontalement des gènes et leurs éléments génétiques porteurs (transposons/intégrons) de bactérie à bactérie, dans de nombreux environnements.

Caractéristiques fondamentales: taille, incompatibilité, exclusion d'entrée, transfert, réplication (Novick 1969, Falkow, 1975)



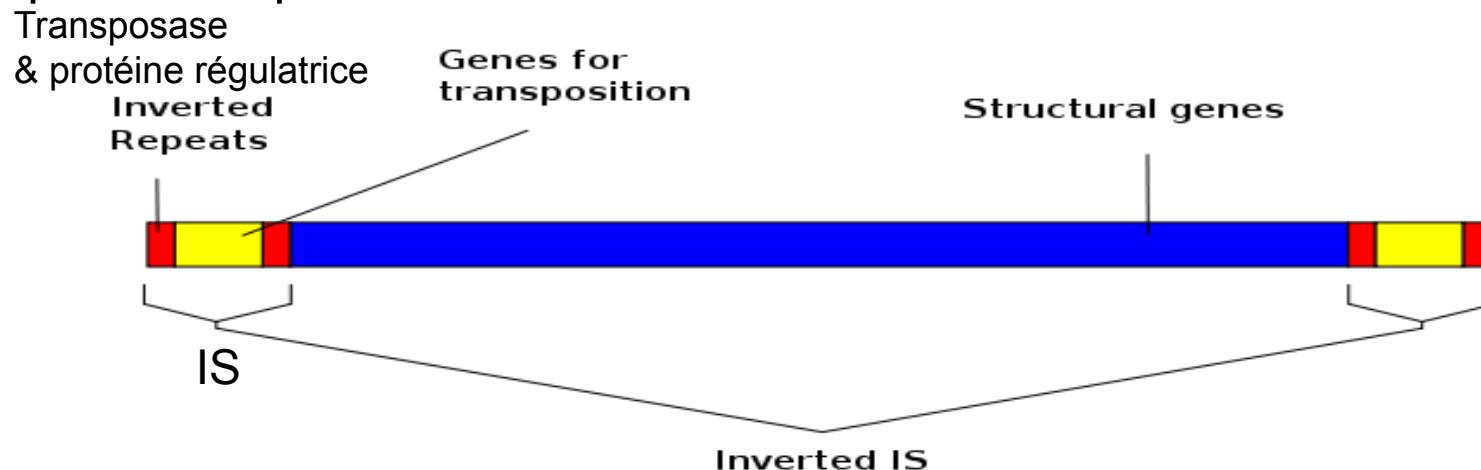
Vecteurs de sauts géniques entre chromosome et plasmides (plasmide-plasmide): **transposons**

Séquences d'insertion (IS) = Eléments transposables les plus simples

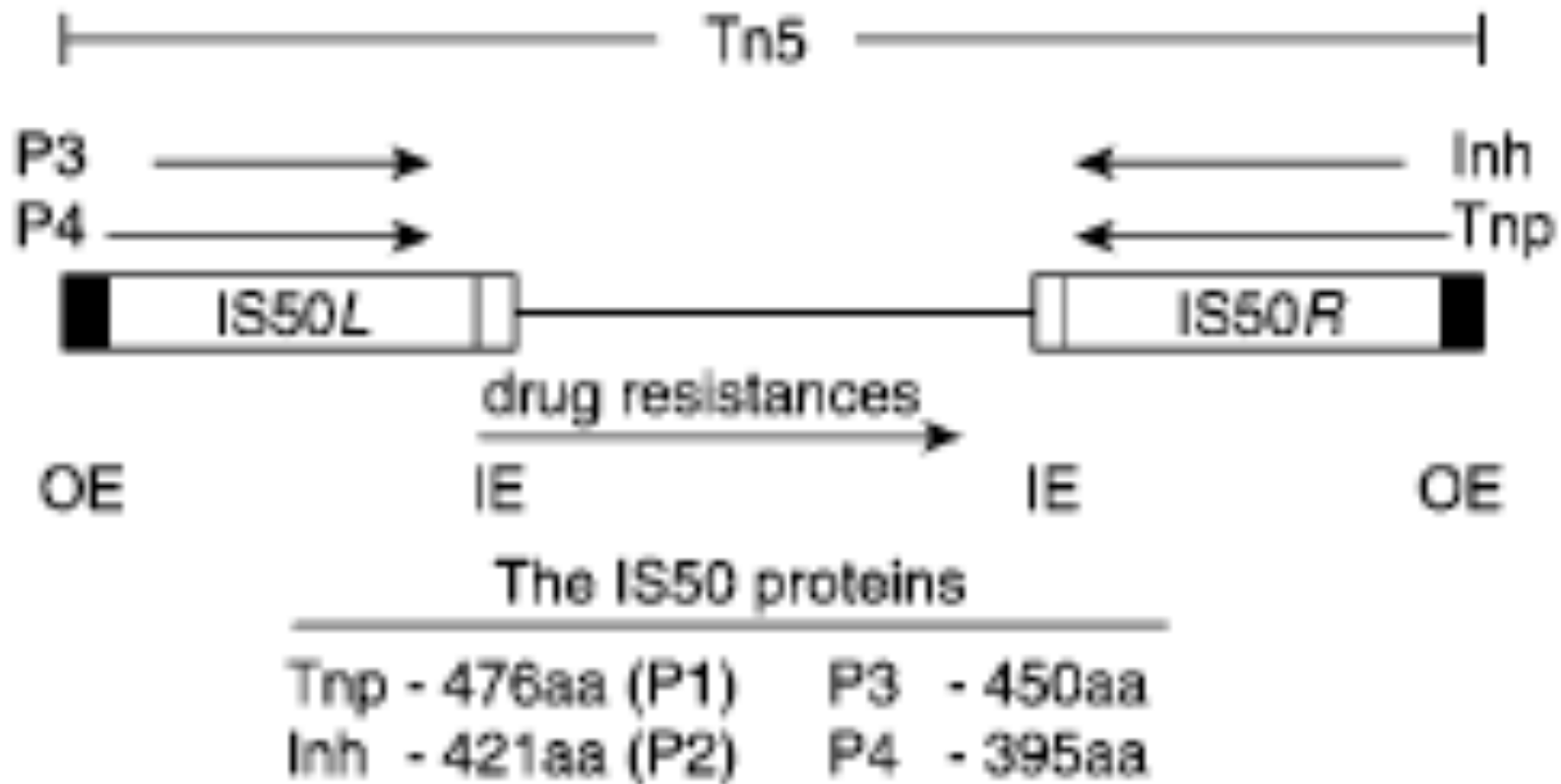
- Un gène codant une transposase encadré par des séquences répétitives inversées (inverted repeat sequences), limitant l'IS et site de reconnaissance par la transposase.
- Reconnaissance sur la cible de deux courtes séquences directement répétées (direct repeat sequences).

Transposon = IS transportant d'autres gènes (résistance aux antibiotiques, métaux lourds, antiseptiques). Toujours encadré de deux IS assurant le saut d'une structure génétique à une autre.

La transposase ne peut fonctionner que si elle reconnaît à la fois les deux courtes séquences répétées sur l'ADN cible et ses propres séquences répétitives inversées.



Tn5: transposon modèle



Deux séquences cibles:

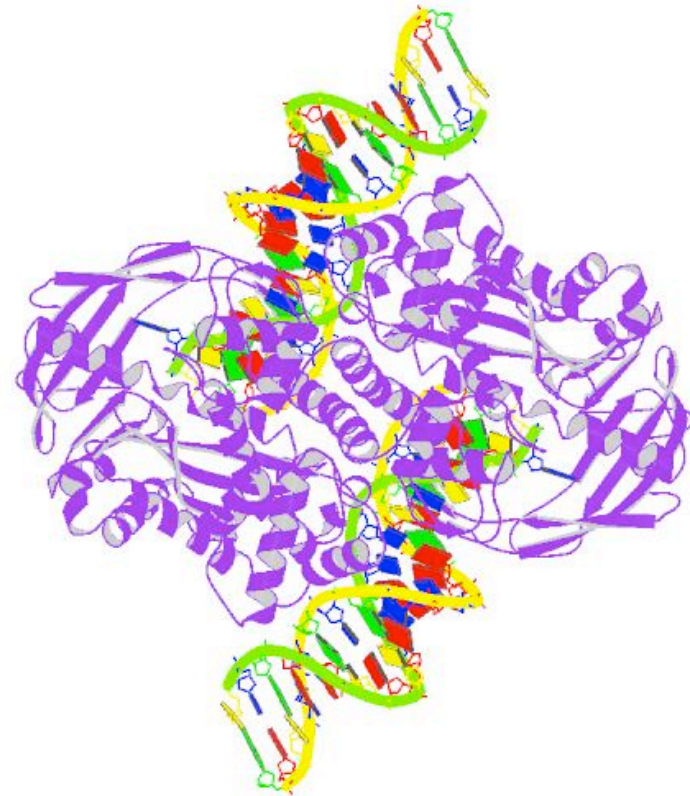
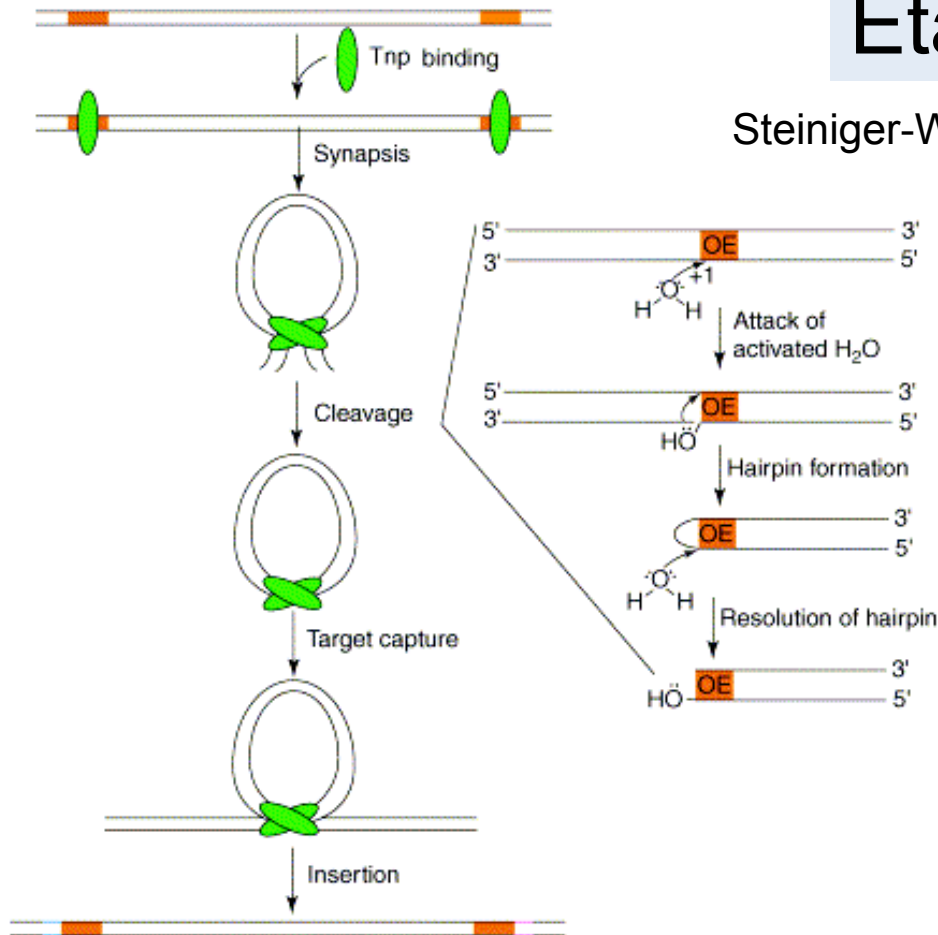
IE (inner): 5'CTGTCTCTTGATCAGATCT3'

OE (outer): 5'CTGACTCTTATACACAAGT3'

Tnp peut se lier indifféremment à OE et IE, mais doit se lier aux deux OE pour que l'évènement d'excision-transposition survienne

Etapes de la transposition

Steiniger-White & coll. 2004 Curr Opin Structural Biology



Transposition débute lorsque deux monomères de Tnp se lient respectivement aux deux séquences cibles OE

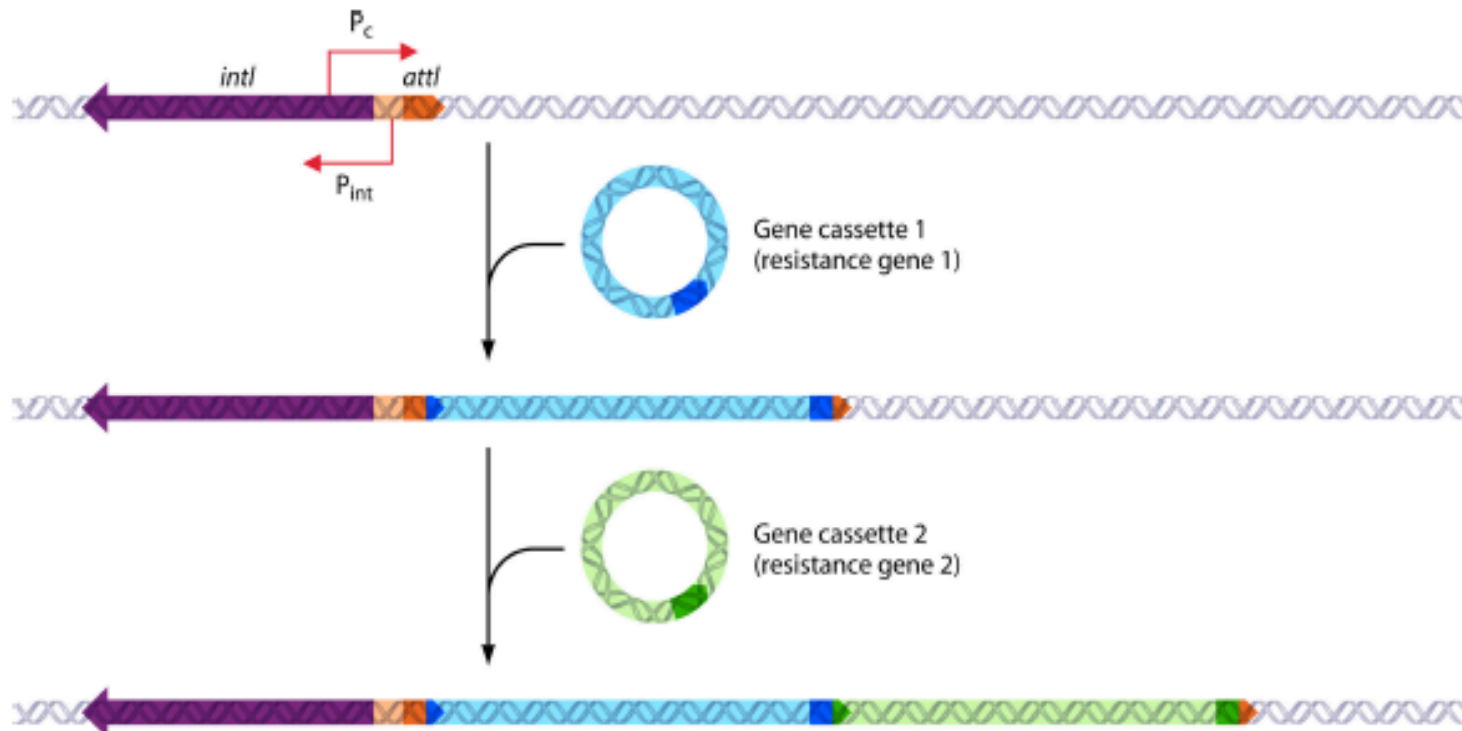
Homodimérisation par l'extrémité C-terminale formant un "complexe synaptique" qui coupe (ouverture de la liaison phosphodiester) l'ADN et expose l'extrémité 3' de OE (ou IE ?)

Attaque nucléophile du brin opposé d'ADN formant une structure intermédiaire en épingle à cheveu à chaque extrémité.

Extrémité 3' régénérée, permettant attaque nucléophile côté 5' et intégration dans l'ADN cible.

Pas de séquence signature de reconnaissance sur l'ADN hétérologue "hot spots" riches en AT

Porteurs/vecteurs de cassettes de résistance: **intégrons**



Principalement chez les bactéries à Gram négatif. Capture, expression, dissémination de gènes permettant l'adaptation bactérienne à des contraintes environnementales (antibiotiques, etc...)

Structure et processus de capture de cassettes:

Intégrase (*int*) + promoteurs (P_{int} & P_c) à son extrémité 3' et **séquence d'attachement/insertion** (*attI*)

Intégrase catalyse l'intégration séquentielle de cassettes de résistance, créant, grâce au promoteurs une structure d'opéron où les gènes de résistance vont être transcrits à partir du promoteur P_{int} .

Vecteurs du transfert horizontal de gènes: intégrons

Très anciens (Mazel & coll, 2006)

Système de recombinaison spécifique de site capable de capturer des gènes individuels localisés sur des cassettes mobiles (Stokes & Hall, 1989)

Plusieurs classes sur la base de la séquence de la recombinase

Quasi exclusivement les Int de classe 1 transmettent des résistances

Pourquoi ? pourquoi si abondants ?

- Essentiellement localisés dans des éléments génétiques très mobiles: plasmides et transposons. Le plus souvent associés aux "restes" d'un Tn (Tn402/Tn5070) ayant perdu son module de transposition (Shapiro & Sporn, 1977). Complémentations en trans.

- Intégrons-Tn402 et équivalents = "Res hunters" qui ciblent le complexe de résolution (Résolvase/Res) important dans la replication et/ou la mobilité des plasmides et des transposons (Kholiidi & coll, 1995)

- Isolat de *P. aeruginosa* du permfrost datant de 15 000 ans montre un intégron de classe 1 présentant toutes les caractéristiques d'un intégron d'isolat clinique de la période antibiotique... (Peron & coll, 2015, PLoS One)

Diversité d'intégrons codant pour des enzymes de résistance, Gram -

Intégrons de classe 1

Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classes A, C, D

β -lactamases classe B

Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases

3 - acétyltransférases

2'' - adénylyltransférases

3'' - adénylyltransférases

Résistance au chloramphénicol

acétyltransférases

mécanisme non enzymatique

Résistance au triméthoprim

dihydrofolate réductases

classes A et B

Résistance à la rifampicine

ADP-ribosyl transférase

Résistance à l'érythromycine

érythromycine estérase

Résistance aux ammoniums quaternaires

Rôle des antiseptiques, en particulier des ammonium quaternaires, comme pression sélective ?.

Intégrons de classe 2

Résistance aux aminosides

3'' - adénylyltransférases

Résistance à la streptomycine

acétyltransférase

Résistance au triméthoprim

dihydrofolate réductases

classes A et B

Intégrons de classe 3

Résistance aux β -lactamines

β -lactamases classe B

Résistance aux aminosides

6' - acétyltransférases

Pourquoi certains éléments mobiles sont-ils plus associés à des gènes de résistance aux antibiotiques?

Coïncidence ?...

Certains groupes d'éléments mobiles pourraient avoir été pré-conditionnés pour diffuser au sein de certaines espèces bactériennes.

Transposons codant pour résistance au mercure. Existaient bien avant l'apparition des antibiotiques modernes par nécessité de détoxification du mercure très prévalent dans l'environnement (réaction de réduction indispensable avec l'apparition de l'O₂ sur la planète qui a rendu le mercure toxique, Barclay & coll, 2010).

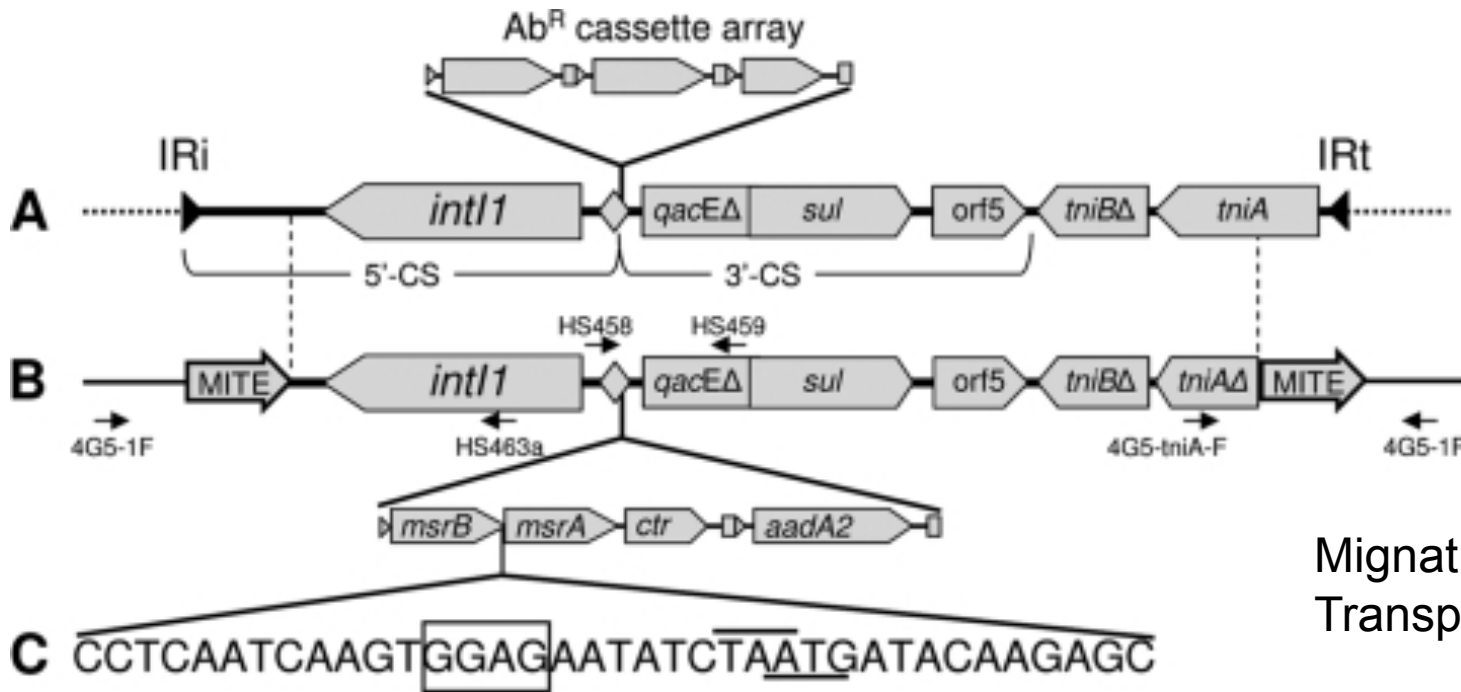
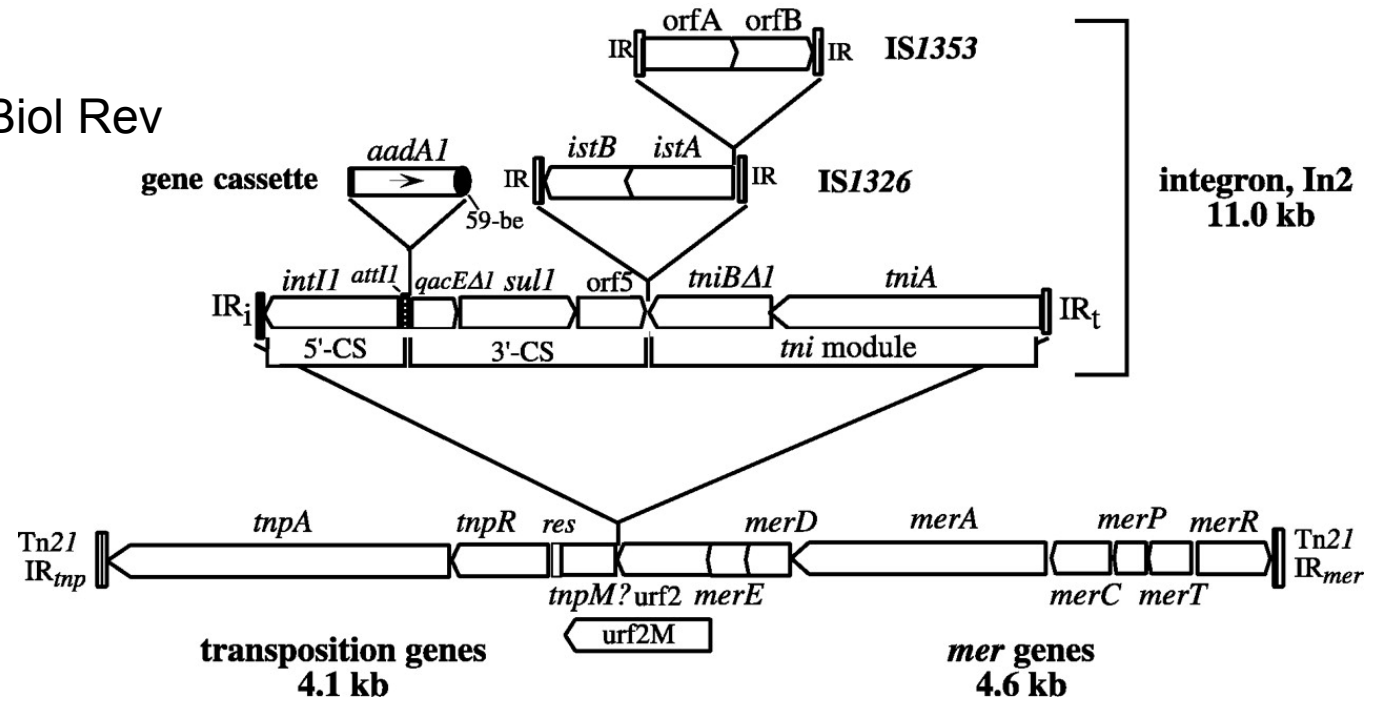
Relai plus récent par antiseptiques contenant du mercure ?

Ayant commencé à capturer des gènes de résistance aux antibiotiques, ce sous-groupe de transposons a pu assurer une rapide évolution des bactéries hôtes sous pression sélective des antibiotiques (Kholodii & coll, 2003).

Meilleur exemple est la famille de Tn21 (Liebert & coll, 1999)

Tn21

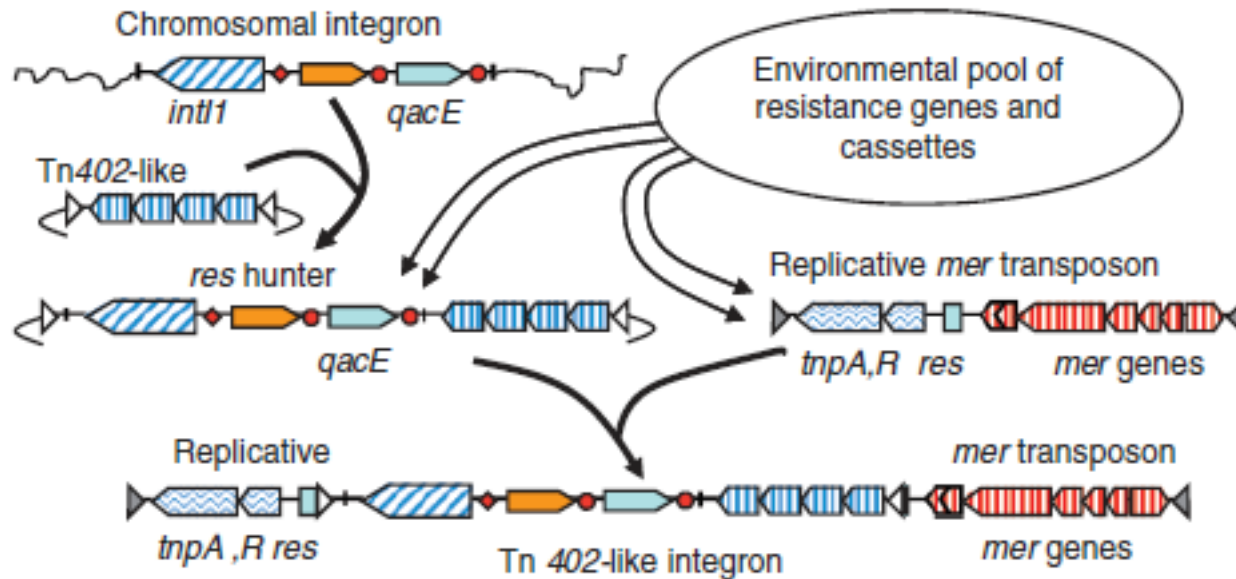
Liebert & coll, 1999, Mol Biol Rev
Opéron *mer*



Tn402-intégron
de classe 1
Gillins et coll, 2009,
Appl Env Microbiol

Mignature Inverted-Repeats
Transposable Elements

Modèle de construction séquentielle d'éléments génétiques "ultramobiles" au sein des bactéries à Gram - "contemporaines"



Les désinfectants ont sélectionné des gènes de résistance aux ammoniums quaternaires dans des intégrons de classe 1 avant les antibiotiques. Cette structure s'est liée à Tn402 (Tn délété) et est devenue mobile. L'usage des antibiotiques y a amené le recrutement de gènes d'antibiorésistance. En parallèle, la contamination de l'environnement microbien (naturelle et thérapeutique) par le mercure a permis le recrutement indépendant de gènes d'antibiorésistance en association avec la résistance au mercure. Les capacités de "res-hunting" (préférence d'insertion dans gène de la résolvasse (*res*) du transposon cible) de Tn402 ont permis de fusionner les système en un élément complexe.

Antibiotiques et résistance aux antibiotiques: longue co-évolution, récente accélération

Ere pré-antibiotique:

Pool global de gènes mobiles, mobilisables et d'éléments génétiques mobilisateurs

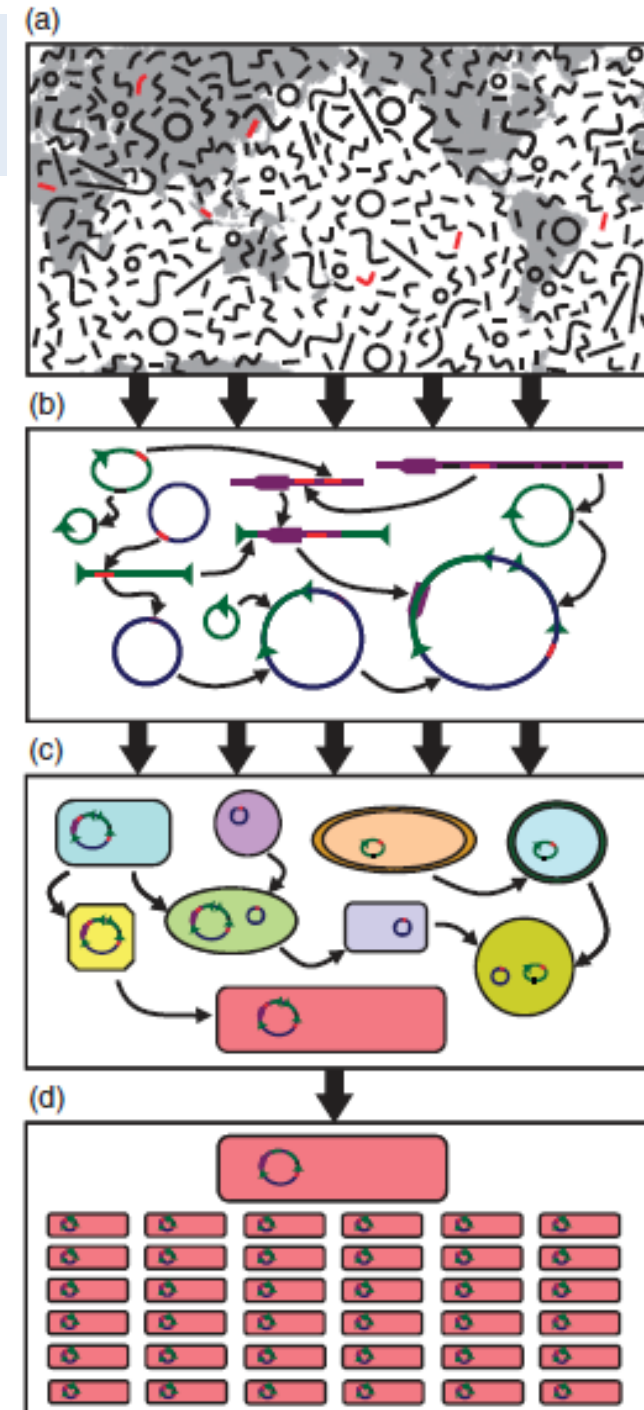
Ere pré- et post-antibiotique:

réarrangement aléatoire d'éléments génétiques mobiles et de gènes d'adaptation à l'environnement de niches variées

Les éléments mobilisateurs touchent des communautés microbiennes diverses, y compris les pathogènes humains

Ere post-antibiotique:

Puissante pression sélective sur les pathogènes humains ayant acquis les gènes de résistance



Rapporteurs : Dr Jean CARLET et Pierre LE COZ



Propositions du groupe de travail spécial
pour la préservation des antibiotiques

Benoît Marteyn

CR1 INSERM

Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire

Institut Pasteur

Ivo Boneca

DR1 INSERM

Chef de l'Unité

Biologie et génétique de la paroi bactérienne

Institut Pasteur

Pourquoi certaines bactéries ne deviennent pas résistantes aux antibiotiques ?