

# Classification et modes d'action des antibiotiques

## A. Historique, définitions

En 1928, Fleming découvre la pénicilline G, elle ne sera utilisée en clinique qu'une dizaine d'années plus tard (1938-1942).

Caractéristiques générales des antibiotiques (ATB) :

- Ce sont, à l'origine des agents antibactériens naturels d'**origine biologique**, élaborés par des champignons (ex : le pénicillium notatum fabrique la pénicilline G) ou des bactéries.
- Actuellement la plupart des ATB sont d'origine synthétique pour la plupart ou hémi synthétique.
- La sélectivité de leur toxicité est directement liée à leur mécanisme d'action
- Leur effet est lent (de l'ordre de quelques heures)
- Ils agissent à faible concentration (de l'ordre du mg/L)

Les caractéristiques des ATB les opposent aux antiseptiques et désinfectants qui sont des agents:

- antibactériens d'origine chimique
- dont la toxicité est brutale et peu sélective (action locale, pas de prise per os)
- d'action rapide (de l'ordre de la minute)
- utilisés a concentration élevée (2eme argument en défaveur de l'utilisation par voie per os)

## B. Classification

### 1. Principe

On parle de familles d'antibiotiques : dans une famille les molécules ont une structure de base commune et le même mécanisme d'action : **classification hybride**

Une famille peut être divisée en groupes et/ou sous-groupes, qui ont des spectres d'activité qui diffèrent.

A l'intérieur des groupes on peut encore séparer les antibiotiques en fonction de leurs propriétés pharmacologiques et de leur tolérance.

### 2. Nature chimique

Dans la classification par nature chimique on a une structure de base, comme par exemple la famille des  $\beta$ -lactamines dont la structure de base est le cycle  $\beta$ -lactame les formules chimiques ne sont pas à connaître, sur lequel s'ajoutent des substituants qui vont faire varier les molécules.

Autres exemples :

- Les aminosides : sucres sur lesquels on a substitué des acides aminés (« sucres aminés »)
- Les macrolides (« macro olide ») : ce sont de grosses molécules avec plusieurs atomes de carbone (elles sont classées selon le nombre d'atomes de carbone).
- La famille des tétracyclines : ce sont des molécules qui possèdent 4 cycles.

### 3. Mécanisme d'action

Il est très variable, selon la cible à l'intérieur de la bactérie. C'est important de la connaître pour savoir pourquoi la bactérie va pouvoir y résister, soit de façon naturelle soit de manière acquise.

### 4. Modalités d'action

Elles se résument en deux notions : un antibiotique peut arrêter la croissance de la bactérie (bactériostase, concerne tous les antibiotiques), et/ou tuer la bactérie (bactéricidie)

### 5. Spectre d'activité

C'est la liste des espèces bactériennes sur lesquelles un antibiotique est susceptible d'agir. Il peut être large (activité de l'antibiotique sur la majorité des espèces gram + et gram -) ou étroit ( ex : anti staphylococciques, antituberculeux...)

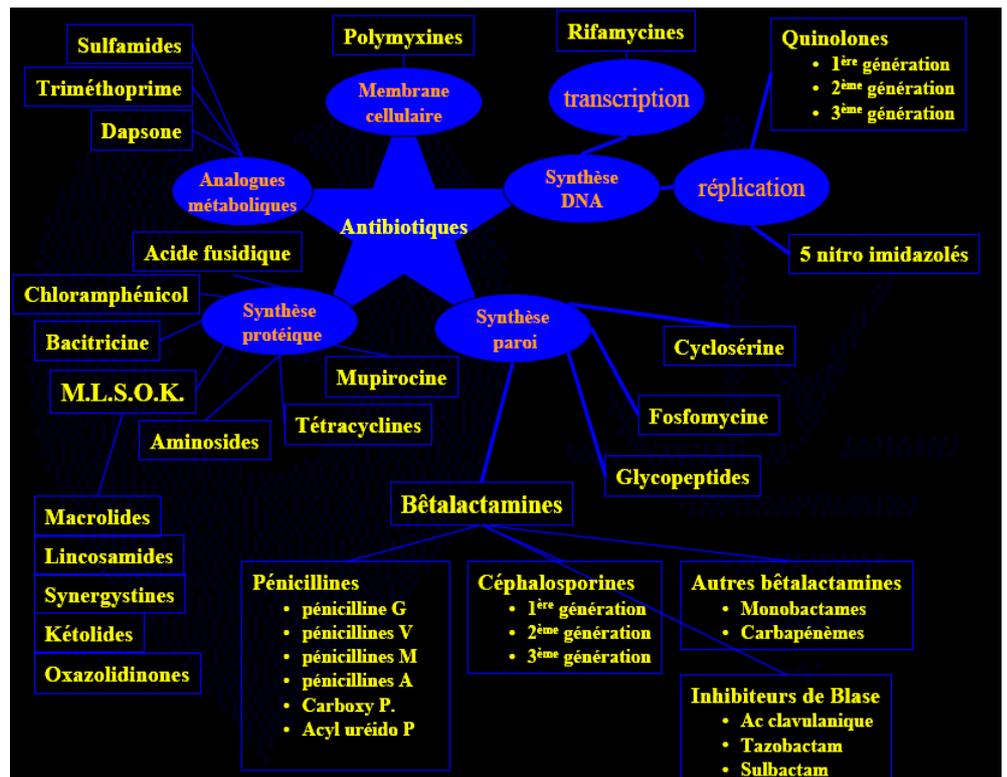
Il dépend de deux paramètres : les résistances naturelles des espèces bactériennes, et les résistances acquises des souches, qui limitent le spectre **initial** de l'antibiotique.

Ex : sur le tableau de droite, on voit que la famille des  $\beta$ -lactamines comporte des antibiotiques de spectres plutôt étroits pour les deux premiers puis larges pour les deux restants.

Famille	Antibiotique	Gram +	Gram -
$\beta$ -Lactamines	Benzylpénicilline	+	-
	Oxacilline	+	-
	Ampicilline	+	+
	Imipénème	+	+
Aminosides	Gentamicine	+	+
	Tobramycine	+	+
Phénicolés	Chloramphénicol	+	+
Tétracyclines	Doxycycline	+	+
Macrolides	Erythromycine	+	-
Glycopeptides	Vancomycine	+	-
Quinolones	Acide nalidixique	-	+
Autres	Acide fusidique	+	-

## II. Mécanismes d'action

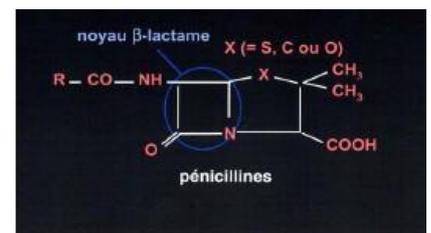
Il existe 4 types : l'inhibition des protéines de synthèse, l'inhibition de la synthèse ou de la fonction des acides nucléiques (l'inhibition de la synthèse des folates, substances du métabolisme intermédiaire aboutit à l'inhibition de la production d'acides nucléiques), inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne, et les antibiotiques ayant une action directe sur la membrane bactérienne.



### A. Antibiotique inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne.

#### Les $\beta$ -lactamines.

Elles sont très nombreuses avec comme noyau de base le cycle  $\beta$ -lactame, indispensable à l'activité de l'antibiotique. Les molécules sont classées en fonction de la nature de leurs cycles et/ou des radicaux. Les cinq groupes cités sont à retenir, en grande priorité les trois premiers :



- Les pénicillines
- Les céphalosporines
- Les carbapénèmes (utilisés surtout en milieu hospitalier)
- Les monobactames
- Les clavames

Les pénicillines :

4 sous groupes utilisés:

**Pénicilline G** : utilisation historique, on ne s'en sert plus aujourd'hui, c'est celle découverte par Fleming, spectre étroit (presque uniquement des gram +) **Pénicilline V** (orale)

**Pénicilline M** : spectre très étroit, anti-staphylococcique uniquement (mécicilline)

**Pénicilline A** : ou aminopénicillines, elles ont le spectre de la pénicilline G, élargi à quelques bactéries gram -.

**Carboxypénicillines, uréidopénicillines** : large spectre, actives sur pseudomonas aeruginosa, s'utilisent principalement en milieu hospitalier.

**Les céphalosporines :**

Très utilisées, classées en générations (3), leur intérêt est l'action qu'elles ont sur les grams - . Le degré d'activité et le spectre des céphalosporines augmentent de s'élargissent avec les nouvelles générations (C1G<C2G<C3G)

**Les carbapénèmes :**

En particulier l'Imipénème : molécule qui possède le spectre le plus large parmi les antibiotiques, de plus elle est très stable vis à vis des  $\beta$ -lactamases. Ertapénème, Doripénème et Méropénème

**Les clavames (inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases) associés aux  $\beta$ -lactamines :**

ex : l'augmentin, qui est une association de l'amoxicilline (pénicilline A) et de l'acide clavulanique (squelette dérivé des pénicilline mais qui n'a **pas d'activité antibactérienne propre**, se fixe sur les  $\beta$ -lactamases qui ne peuvent plus détruire l'amoxicilline) Ac clavulanique, Tazobactam et Sulbactam.

**les monobactames :**

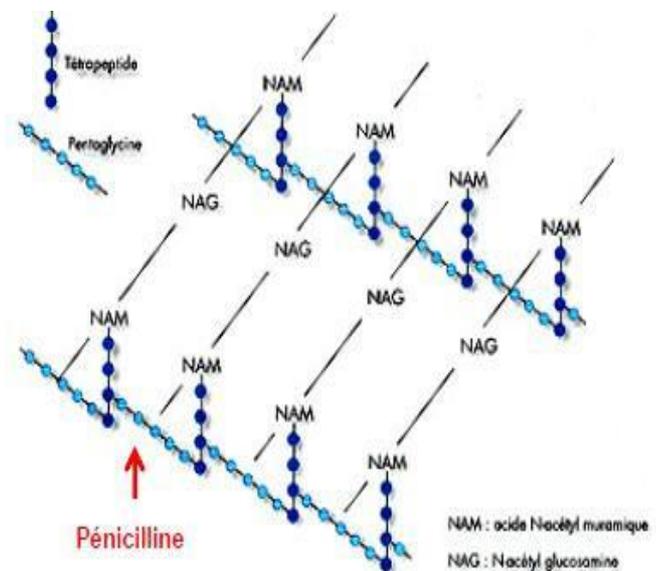
Petites molécules dont le noyau est limité au cycle  $\beta$ -lactame et dont le spectre est limité aux bacilles gram - aérobies.

**Mécanisme d'action.**

Schéma sur le peptidoglycane : réseau 3D de sucres, de chaînes polysidiques reliées entre elles par de courtes chaînes peptidiques (tétrapeptides).

Les  $\beta$ -lactamines ciblent des enzymes, notamment les **PLP** (protéines liant les pénicillines, dont le nombre varie selon l'espèce bactérienne) sur lesquelles elles se fixent par analogie structurale pour les inhiber.

L'affinité pour les différentes PLP varie selon la molécule de  $\beta$ -lactamine.



Quand la  $\beta$ -lactamine se fixe sur les PLP, elle inhibe la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (formation des ponts peptidiques), ce qui implique qu'elles ne sont actives que sur des bactéries en phase de croissance.

Effets des  $\beta$ -lactamines : il y a deux types,

- Effet direct : en se fixant sur les PLP, elles entraînent la formation de sphéroplast (bactérie devient ronde) et de filaments, avec arrêt de la croissance bactérienne, c'est l'effet de bactériostase.
- Effet indirect : Bactéricidie, due à l'activation des autolysines bactériennes (car la bactérie va détruire le peptidoglycane dont la synthèse a été avortée par l'inhibition des PLP)

### **Glycopeptides**

2 molécules à retenir : **vancomycine et teicoplanine**. Les glycopeptides agissent également sur la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en inhibant le fonctionnement de certaines enzymes par encombrement stérique.

Ce sont des antibiotiques lentement bactéricides qui ne ciblent que les bactéries gram + et sont totalement inactifs sur les gram -, étant trop volumineux pour traverser la membrane externe. (On les utilise surtout en hôpital, sur des infections sévères à staphylocoques méticilline-résistants et entérocoques)

### **Fosfomycine**

C'est un antibiotique naturel, produit par notre organisme, qui possède un spectre large (gram + et -) et qui est capable de franchir la membrane cytoplasmique par transport **actif**, son action se situe plutôt au début de la synthèse du peptidoglycane.

### **B. Antibiotiques actifs sur les membranes.**

Ça peut aussi bien être sur la membrane externe (gram-) que sur la membrane cytoplasmique. Une classe à retenir : les polymyxines avec un agent à connaître : **la colistine**. Elles ciblent les membranes lipidiques (externe et cytoplasmique) en agissant comme des détergents, c'est à dire qu'elles désorganisent les membranes ce qui aboutit à la mort rapide des bactéries, les polymyxines sont donc bactéricides. (Et qui agissent sur des bactéries en phase de croissance ou **au repos**)

### **C. Antibiotiques inhibant la biosynthèse des protéines.**

Certains antibiotiques agissent sur la petite sous-unité du ribosome 30s (tétracyclines et aminosides) et d'autres sur la grande 50s (macrolides et apparentés).

#### **2. Les tétracyclines.**

- Structure : noyau de quatre cycles portant des substituants. 2 molécules à connaître : la tétracycline et la doxycycline (une 3<sup>ème</sup> molécule un peu moins importante : la minocycline)
- Mécanisme d'action : Se fixent sur la petite sous-unité du ribosome et plus précisément sur l'ARNr 16s, ce qui inhibe la fixation du complexe acide aminé-ARNt sur le site aminé A du ribosome (phase de reconnaissance) ce qui inhibe la synthèse protéique. Leur action est bactériostatique.
- Spectre : large, sur beaucoup d'espèces gram + et gram -, les mycoplasmes, les chlamydiae, mais au fil des années de nombreuses résistances sont apparues et leur large spectre d'action peut créer un déséquilibre de la flore digestive.

#### **3. Les aminosides**

- Molécules à connaître : Amikacine et gentamicine (utilisation plutôt hospitalière car ils ont une toxicité auditive et rénale)
- Mécanisme d'action : un peu particulier pour la pénétration de l'antibiotique qui se fait par transport actif grâce aux enzymes de la respiration bactérienne. Les bactéries qui sont anaérobie, stricte ou facultatifs a

dominante anaérobie (comme les streptocoques), et qui sont donc dépourvues dans enzymes de la respiration bactérienne (catalase, oxydase, cytochrome oxydase) sont insensibles aux aminosides. A l'intérieur de la bactérie ils se fixent sur l'ARNr 16s de la petite sous-unité et inhibent la translocation. Ce sont des antibiotiques bactéricides.

- Spectre : large.

#### **4. Macrolides, lincosamides, streptogramines, kétolides = MLSK**

Ce sont plusieurs groupes au sein d'une même grande famille. Ils ont une structure différente, mais un mécanisme d'action similaire

Molécules à connaître :

- Macrolides : érythromycine, azithromycine
  - Lincosamides : clindamycine
  - Streptogramines : pristinamycine
  - Kétolides : télithromycine
- Mécanisme d'action : Se fixent sur l'ARNr 23s de la grande sous-unité du ribosome, inhibent la phase d'élongation, entraînent des erreurs de lecture, une interruption prématurée de la traduction du polypeptide (en général on obtient de petits polypeptides de 4 à 5 acides aminés, complètement inutiles à la bactérie). Ce sont des antibiotiques bactériostatiques.
  - Spectre : les MLSK sont actifs sur les gram + uniquement car ils ne peuvent pas franchir la membrane externe des Gram -. Cependant ils sont aussi actifs sur les bactéries atypiques : mycoplasmes, chlamydiae, légionnelles...

#### **D. Antibiotique inhibant la biosynthèse ou les fonctions des acides nucléiques.**

On va prendre quatre exemples: quinolones, sulfamides et triméthoprime, rifampicine, nitroimidazolés.

##### **1. Quinolones et fluoroquinolones**

On a plusieurs molécules: -les quinolones, les premières, sont les moins actives  
-les fluoroquinolones, plus actives

- Molécules : Exemples :Acide nalidixique (quinolones)  
Ofloxacine, ciprofloxacine (fluoroquinolones)

- Mécanisme d'action :

Ces molécules vont bloquer la synthèse de l'ADN au niveau de deux enzymes qui ont un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN : - ADN gyrase -Topoisomérase IV

Ce sont des antibiotiques bactéricides.

- Spectre : Les quinolones ont un spectre étroit (essentiellement les entérobactéries).  
Les fluoroquinolones ont un spectre beaucoup plus large (BGN, BGP) . Le fait d'avoir ajouté un atome de fluor augmente le spectre (antibiotiques actifs pour les bactéries à gram- et gram+).

##### **2. Sulfamides et triméthoprime**

- Mécanisme d'action :

- Ils inhibent la synthèse des folates qui ont un rôle dans la synthèse des acides nucléiques. Donc, en inhibant la synthèse des folates, il va y avoir une inhibition de la synthèse des acides nucléiques.
- Ces antibiotiques sont capables d'inhiber des enzymes (inhibition compétitive) ayant un rôle dans la synthèse de l'acide tétrahydrofolique, précurseur des bases puriques et pyrimidiques.
- Les sulfamides et triméthoprime inhibent chacun une étape différente de cette synthèse car ils inhibent chacun une enzyme différente.
- Les sulfamides et triméthoprime seules sont bactériostatiques.

Lorsqu'on associe les deux, on a un nouvel antibiotique: cotrimoxazole (Bactrim), bactéricide.

### **3. Nitroimidazolés**

Ce sont des antibiotiques actifs à l'état réduit et qui n'agissent que sur les anaérobies. Ils vont se fixer sur les dérivés réduits de l'ADN et entraînent une coupure des brins d'ADN. Ils ont donc une action bactéricide.

Un exemple à retenir, très utilisé sur les bactéries en milieu anaérobie, le métronidazole (Flagyl).

### **4. Rifampicine**

Cet antibiotique inhibe l'ARN polymérase ADN dépendante et donc la transcription de l'ADN en ARNm.

C'est un antituberculeux majeur.

## Mécanismes de résistance aux antibiotiques

### III. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

- Il s'agit d'un problème de santé publique.
- L'antibiotique est un bien durable, à protéger. A vouloir trop les utiliser et n'importe comment, les bactéries y résistent de plus en plus.
- Le phénomène de résistance aux antibiotiques est observé en milieu communautaire et en milieu hospitalier (infections nosocomiales).
- La résistance est connue pour toutes les familles d'antibiotiques et pour toutes les espèces bactériennes. Pas un antibiotique n'échappe à la résistance et pratiquement toutes les bactéries sont capables de développer des résistances à un antibiotique.

#### A. Caractéristiques de la résistance bactérienne

- Nous avons vu qu'il y a une émergence plus ou moins rapide après l'introduction de l'antibiotique.
- Il faut 8 à 10 ans pour sortir un antibiotique sur le marché. Entre la synthèse de la molécule et l'utilisation chez le patient, il y aura eu des études en laboratoire qui auront essayé d'obtenir des résistances pour voir comment ça marche et comment on peut les prévenir.
- La fréquence est en augmentation et la résistance varie selon les antibiotiques.
- La résistance est transférable, ce qui pose problème pour le traitement des patients. En effet, on a des gènes de résistance qui peuvent être portés sur des plasmides, sur des transposons ou des intégrons.
- La résistance peut donc passer d'une bactérie à une autre et il peut y avoir une diffusion au sein des patients d'un même service. Il s'agit alors d'une diffusion épidémique de certains gènes de résistance.
- Tout d'un coup, on a tous les patients d'une unité de soins intensifs qui présentent une bactérie multirésistante (**BMR**). Ceci est dû à une addition des mécanismes de résistance..

#### B. Principaux types de résistance

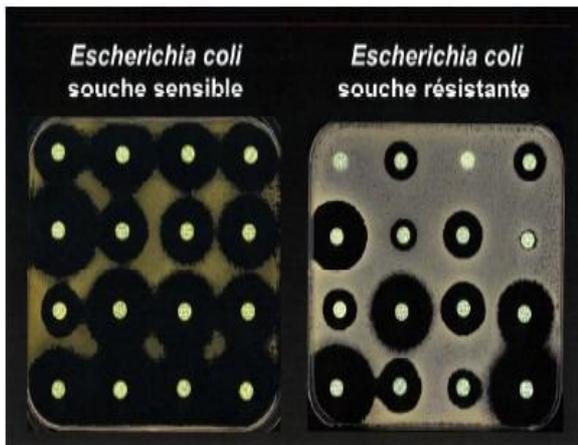
Il existe deux types de résistance: -naturelle

##### **1. Résistance naturelle**

- Elle va caractériser un genre ou une espèce bactérienne. Cette résistance naturelle va toucher toutes les souches d'une espèce bactérienne. C'est le caractère normal de la bactérie (on parle de phénotype normal ou « sauvage »).
- Cette résistance naturelle va définir le spectre clinique d'un antibiotique.
- Pour qu'elle soit transmissible à toutes les souches d'une espèce, il faut que cette résistance soit portée par le chromosome bactérien. Ce gène peut être transmis verticalement.

## 2. Résistance acquise

- Elle est propre à certaines souches d'une espèce. Elle n'utilise pas toutes les souches d'une espèce bactérienne.
- Sa proportion est variable dans le temps.
- Il y a acquisition d'un ou plusieurs mécanismes de résistance. Contrairement à la résistance naturelle qui est un phénotype normal, on a ici un phénotype anormal.
- La transmission horizontale est possible. Elle est permise par des plasmides ou les transposons qui sont des éléments transférables. La bactérie qui a acquis ce mécanisme de résistance peut le transférer à la voisine: c'est la diffusion épidémique.
- On a des espèces qui sont plus concernées que d'autres par ce mécanisme de transmission acquise. Il s'agit de bactéries à gram+ comme le staphylocoque et le pneumocoque mais aussi de bactéries à gram-. Ca existe aussi pour des espèces habituellement sensibles.



Voici un antibiogramme. Sur cette boîte de gélose, on a mis la bactérie et on dépose ensuite des disques contenant des concentrations connues d'antibiotiques. Autour des disques, se trouvent les diamètres d'inhibition de croissance. Après avoir mesuré les diamètres, on peut dire si la bactérie est sensible ou résistante.

Sur la première image la souche est sensible à tous les antibiotiques pour lesquels elle est testée. Sur la seconde image, la souche a acquis des mécanismes de résistance. En effet, pour certains antibiotiques, la bactérie pousse au contact du disque, le diamètre est très diminué. Donc, l'antibiotique ne marche pas.

### C. Support génétique de la résistance

On peut avoir des mutations qui existent déjà ou des transferts de gènes.

#### 1. Mutations affectant des gènes pré-existants

- **Définition :** Une mutation est un événement rare (la fréquence varie de  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$ ), spontané, stable, héréditaire, de transmission verticale.
- **Ces mutations peuvent concerner tous les gènes: des gènes de structure ou de régulation, des gènes portés par le chromosome ou portés par le plasmide.**
- Dans le cadre de la résistance aux antibiotiques, il peut s'agir de mutations:
  - d'une porine (protéine de la membrane externe) qui va disparaître ou diminuer considérablement de diamètre entraînant alors une imperméabilité
  - de l'ADN gyrase (cible des fluoroquinolones)
  - d'une protéine ribosomique qui va entraîner une résistance aux antibiotiques qui ciblent les ribosomes -de l'ARN polymérase qui va entraîner la résistance à la rifampicine
  - Ce sont des mutations de gènes de structure qui entraînent une résistance aux antibiotiques ciblant ces gènes là. Le plus souvent une mutation confère la résistance à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques puisque les mutations sont indépendantes et spécifiques.
  - L'antibiotique n'est pas mutagène mais va sélectionner les rares mutants qui existaient déjà au sein de la population bactérienne sensible. Ces mutants n'avaient pas besoin de se développer puisque ils n'étaient pas mis en contact avec l'antibiotique.
- **Conséquences: nécessité d'associer des antibiotiques dans certains cas:**

-tuberculose: il faut associer quatre antibiotiques différents pour être sûr qu'au moins un des quatre va marcher car c'est une bactérie qui mute beaucoup

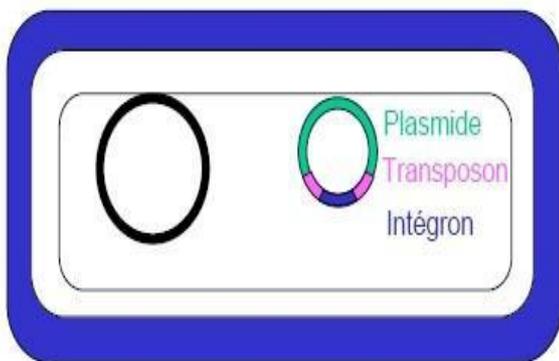
-pour antibiotiques à forts taux de mutation: **quinolones, rifampicine, fosfomycine, acide fusidique**. Il vaut mieux les associer lorsqu'on a une infection sévère afin d'être sûr qu'au moins un des deux marche.

- Les mutations représentent à peu près 10 à 20% de la résistance.

## 2. Résistance par acquisition de gènes

- **Concerne 80-90% de la résistance.**
- **Caractéristiques :** Il y a trois mécanismes de transfert horizontal: la transformation (c'est de l'ADN libre, les bactéries sont compétentes), la conjugaison (nécessite un contact entre les bactéries avec transfert de plasmide), la transduction (mécanisme de transfert par l'intermédiaire d'un phage, petit virus qui va injecter de l'ADN bactérien à l'intérieur de la bactérie réceptrice). Par l'intermédiaire de ces trois mécanismes, on a un apport d'information génétique exogène via des éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance.

Ce schéma représente une bactérie à l'intérieur de laquelle se trouvent des éléments extra-chromosomiques comme le plasmide, des éléments génétiques mobiles (transposon et intégron). Les transposons, plus petits que le plasmide, peuvent être présents sur le plasmide mais aussi sur le chromosome. L'intégron, encore plus petit, n'héberge que des gènes de résistance et peut se situer sur le transposon, sur le plasmide ou encore sur le chromosome.



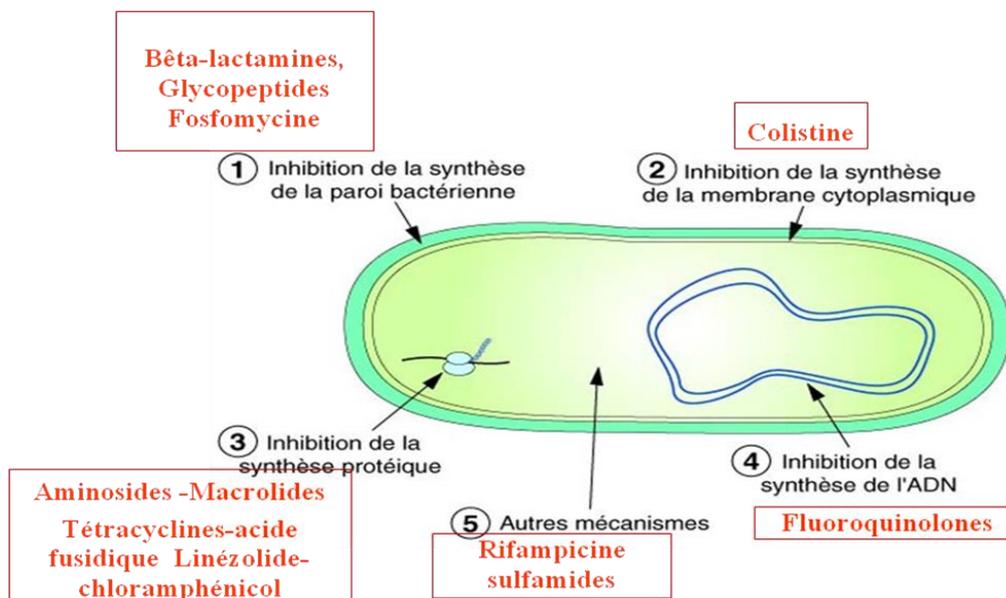
- Les plasmides peuvent être transmis de façon horizontale, plutôt par conjugaison pour les bactéries à gram- et plutôt par transduction pour les bactéries à gram+. Suivant le plasmide, on a une spécificité étroite ou large. Quand on a une spécificité large, le plasmide peut passer d'une bactérie d'une espèce différente à une autre. Lorsque la spécificité est étroite, le plasmide va pouvoir être échangé uniquement au sein de la même espèce.

- Toutes les bactéries peuvent s'échanger des gènes par ces mécanismes sauf les mycobactéries. Tous les

antibiotiques sont concernés par cette résistance par acquisition de gènes sauf les polymyxines et les furanes.

- **La notion de pression de sélection des antibiotiques est très importante.** La bactérie va devenir résistante si on la met en présence d'un antibiotique. Si elle n'est pas mise en contact avec l'antibiotique, elle n'a pas besoin de transférer des gènes qui vont porter la résistance aux antibiotiques. Il faut avoir un usage raisonné des antibiotiques, prescrire un antibiotique n'est pas anodin. Si vous prescrivez un antibiotique pour une infection virale, on n'aura aucun effet sur l'infection virale et on risque de sélectionner des résistances au sein des bactéries naturellement présentes dans l'organisme.

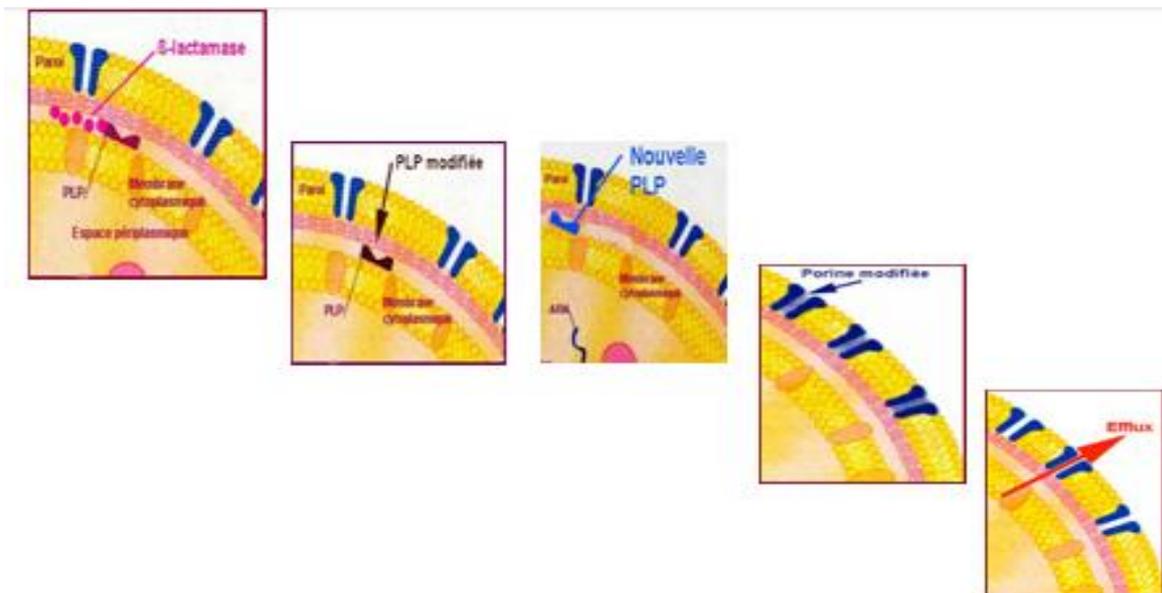
## D. Mécanismes biochimiques de la résistance



## MECANISMES FONDAMENTAUX DE LA RESISTANCE

- **Inactivation de l'antibiotique** +++  
-destruction de l'ATB
- **Altération de la cible de l'ATB**  
(Modification, dégradation, substitution)  
modification de sa structure
- **Absence de pénétration de l'ATB**  
diminution de la perméabilité (paroi, porines)
- **Sortie excessive de l'ATB** (efflux).

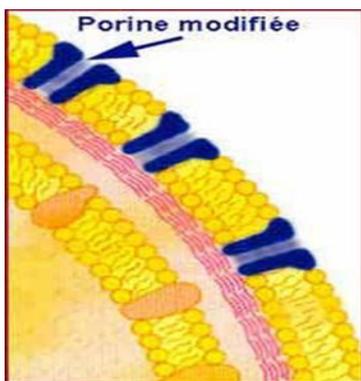
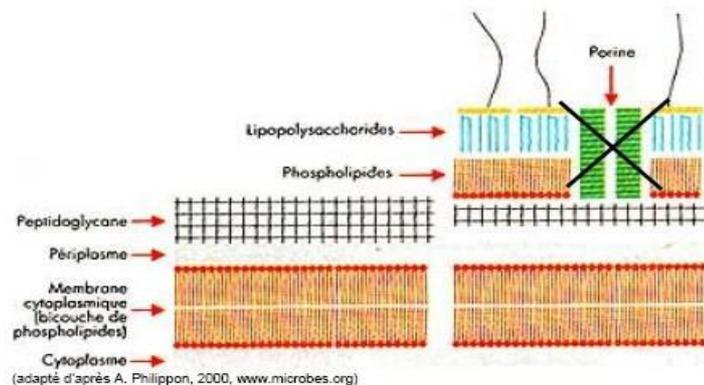
### Exemple : bêtalactamines



#### 1. Défaut de pénétration de l'antibiotique: Imperméabilité

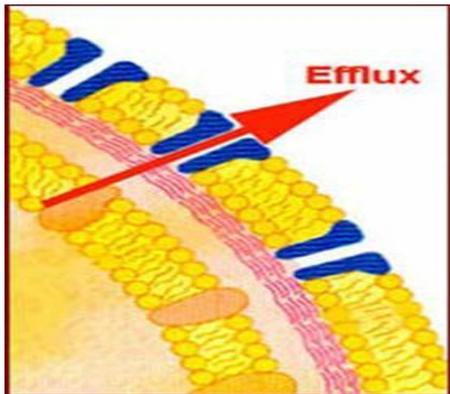
On revient sur ce schéma (rappel: les bactéries gram- ont, en plus, la membrane externe).

Les antibiotiques peuvent passer par les porines. Il s'agit d'antibiotiques hydrophiles et de petites tailles.  
Les antibiotiques hydrophobes passent par le lipopolysaccharide. Ils vont détruire les lipopolysaccharides et vont ensuite pénétrer à travers les phospholipides et les peptidoglycanes.



- Résistance naturelle aux antibiotiques hydrophiles et de masse moléculaire élevée (macrolides, glycopeptides). En effet, ils ne vont pas pouvoir passer par la porine parce qu'ils sont trop gros et, comme ils sont hydrophiles, ils n'arrivent pas à désorganiser le lipopolysaccharide. Ce sont des antibiotiques qui, naturellement, seront inactifs sur les bactéries à gram- par imperméabilité.
- Résistance acquise avec des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines. On a alors une disparition de la porine ou un diamètre plus étroit. Les antibiotiques ne pourront plus passer, on parle d'imperméabilité.

## 2. Défaut d'accumulation de l'antibiotique par efflux actif



La bactérie va exporter l'antibiotique en dehors d'elle-même et ce phénomène nécessite de l'énergie.

L'efflux actif peut concerner plusieurs familles d'antibiotiques ou une seule famille d'antibiotiques. Lorsque plusieurs familles d'antibiotiques sont concernées (fluoroquinolones, tétracyclines, aminosides,  $\beta$ -lactamines ...), on parle de MDR (Multi Drug Resistance).

- Ces systèmes ne marchent qu'avec de l'énergie. Les protéines de la membrane vont former un système capable d'effluer l'antibiotique en dehors de la bactérie. Ce sont des systèmes de protéines transmembranaires plus ou moins compliqués.

## 3 Inactivation enzymatique de l'antibiotique

a. Hydrolyse: Exemple des  $\beta$ -lactamases hydrolysant les  $\beta$  lactamines

- Les enzymes vont être capables de détruire les antibiotiques.
- Les  $\beta$ -lactamases sont nombreuses, on peut les classer par leur déterminisme génétique, le spectre d'hydrolyse...
- Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent et ouvrent le cycle  $\beta$ -lactame.

**En présence d'eau et de  $\beta$ -lactamases, on a ouverture du cycle  $\beta$ -lactame.**

On peut avoir des  $\beta$ -lactamases plasmidiques et des  $\beta$ -lactamases portées par le chromosome.

Les pénicillinases vont hydrolyser les pénicillines.

• Nombreuses variétés, exemples : On a des

**pénicillinases** qui vont hydrolyser uniquement les pénicillines G et A. Cela entraîne une résistance acquise aux pénicillines G et A chez le staphylocoque doré. Il s'agit ici d'un spectre étroit de la  $\beta$ -lactamase. Au

contraire, **les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE)** entraîne une résistance acquise à toutes les pénicillines et à toutes les céphalosporines. Ca touche toutes les  $\beta$ -lactamines sauf les carbapénèmes.

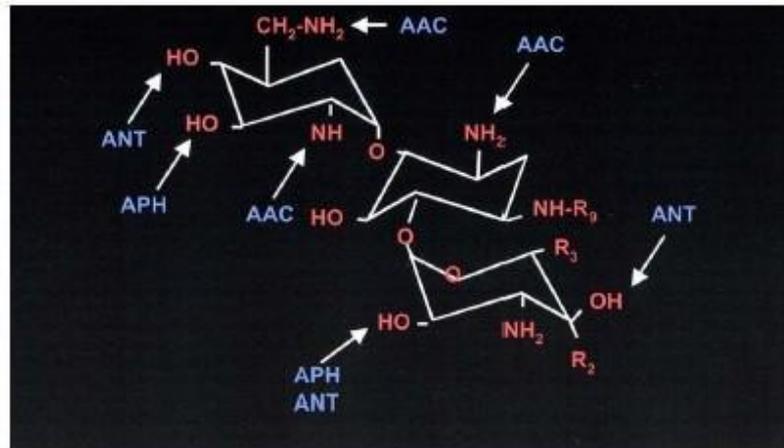
Ces BLSE on les trouve chez les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) surtout responsables d'infections nosocomiales. Chez un patient hospitalisé en soins intensifs, on va rechercher toutes les semaines s'il n'est pas porteur de BLSE. On cherche à savoir si les bactéries au niveau de son tube digestif portent cette BLSE. Dans le cas où le patient serait porteur, il faudrait l'isoler. Actuellement émerge **les carbapénèmases**

#### b. Modification exemple des enzymes modifiant les aminosides

Il peut s'agir de

phosphorylases (phosphorylation: APH), de nucléotides transférases (nucléotidylation: ANT), des acétyltransférases (acétylation: AAC).

Toutes ces transférases vont apporter des modifications sur les radicaux des aminosides et vont les inactiver.



#### 4. Défaut d'affinité de la cible de l'antibiotique

##### a. Modification du site d'action de l'antibiotique

- Les sites d'action des  $\beta$ -lactamines sont les PLP.
- Lorsque les PLP sont altérées, elles vont rendre la bactérie insensible aux  $\beta$ -lactamines.

On va prendre deux exemples: une infection nosocomiale et une infection communautaire.

-Le staphylocoque doré (**staphylocoque aureus**) est résistant à la **méticilline (SARM)**.

Certains staphylocoques ont été capables de développer un mécanisme de résistance vis à vis de cette pénicilline. Pour cela, ils ont acquis une PLP additionnelle, appelée PLP2a ou PLP2', de très faible affinité pour la méticilline et toutes les autres  $\beta$ -lactamines. Ils deviennent donc résistants à toutes  $\beta$ -lactamines. Cette PLP2a est codée par le gène *mecA* intégré dans le chromosome. Son origine est inconnue mais il y a probablement une transmission horizontale avec **d'autres espèces de staphylocoques**.

-**Les pneumocoques de sensibilité diminuée aux pénicillines (PSDP)**

Dans ce cas il ne s'agit pas de l'acquisition d'une nouvelle PLP mais d'une modification d'une PLP pré-existante. Ceci entraîne une diminution d'affinité des  $\beta$ -lactamines pour les PLP. Il y a eu un réarrangement des gènes de structure qui codent pour les PLP après acquisition de matériel exogène par transformation.

Le pneumocoque est une bactérie naturellement compétente (peut acquérir naturellement de l'ADN libre). Il est naturellement dans la gorge, en même temps que les streptocoques oraux. Lorsqu'on donne des antibiotiques pour une angine d'origine virale, il va y avoir sélection de mutants résistants au niveau des streptocoques oraux. Des mutations vont se produire au niveau des PLP des streptocoques oraux. De façon naturelle, les streptocoques oraux vont finir par être détruits et on va avoir des fragments de gènes de PLP mutés qui vont se balader dans la sphère ORL et vont pouvoir rentrer à l'intérieur des pneumocoques. Lorsque les gènes de PLP mutés vont rentrer

dans le pneumocoque, il va y avoir substitution de la PLP mutée au niveau de la PLP sensible et donc un réarrangement par recombinaison homologue.

Les PLP altérées sont codées par des gènes « mosaïques » avec des blocs de séquences « sensibles » remplacés par des blocs de séquences « résistantes » provenant de streptocoques non groupables, commensaux.

C'est de cette manière que le pneumocoque est devenu résistant aux  $\beta$ -lactamines et qu'on a commencé à s'en inquiéter en développant des campagnes: **LES ANTIBIOTIQUES C'EST PAS AUTOMATIQUE !**

#### b. Protection de la cible

- La cible peut être modifiée mais aussi protégée.
- On va considérer l'exemple de la résistance aux tétracyclines. Certaines bactéries ont acquis un gène Tet(M) codant pour la protéine Tet(M) qui va protéger le ribosome de l'action des tétracyclines. La cible des tétracyclines n'est plus accessible et donc l'antibiotique ne peut plus s'y fixer.

De la nature de ce mécanisme dépendent:

- **le niveau de résistance** : suivant le mécanisme, on a un niveau de résistance plus ou moins élevé et donc une augmentation de la CMI plus ou moins élevée. Par exemple, l'imperméabilité va multiplier par dix la CMI de l'antibiotique. En revanche, une enzyme peut entraîner la multiplication de la CMI par un facteur 1000. Dans ce cas, on est plus sûr que la concentration de l'antibiotique dans l'organisme puisse être supérieure à la CMI. On a un risque d'échec.
- **plusieurs mécanismes de résistance possibles pour un antibiotique**

exemple: on peut avoir une bactérie qui a une  $\beta$ -lactamase qui va hydrolyser les  $\beta$ -lactamines, un système d'efflux pour faire sortir une  $\beta$ -lactamine hors de la bactérie et une PLP modifiée.

- **une résistance croisée ou non** entre antibiotiques de même famille ou de famille différente.

**En résumé :** Mécanismes principaux de résistance en fonction de la famille d'ATB :

<b>Béta lactamines</b>	Essentiellement due à la synthèse de bêtalactamases (penicillinases , céphalosporinases blse.... qui inactivent l'ATB. Surtt pr les BGN. Pr les BGN, il existe en plus une diminution de la perméabilité par modification des porines. Pr les BGP, diminution de l'affinité des PLP pour les $\beta$ -lactamines.
<b>Macrolides</b>	La résistance acquise aux macrolides est due principalement à la méthylation de la cible sur la sous-unité 50S du ribosome empêchant la liaison avec l'antibiotique. Résistance constitutive permanente=> résistance croisée avec apparentée : linco et synergistine Résistance inductible par ATB => résistance pour Macro, Linco et synerG reste sensible
<b>Tétra cyclines</b>	La résistance est essentiellement de type plasmidique=> Le mécanisme le + fréquent est le blocage de l'efflux mais aussi diminution de l'affinité de la cible ribosomale
<b>quinolones</b>	Liée à des mutations de l'ADN gyrase ou des modifications de perméabilité à l'ATB. les résistances d'origine chromosomique. Résistance plasmidique ( QNR)
<b>Aminosides</b>	<b>Résistance naturelle:</b> Les aminosides doivent pénétrer à l'intérieur de la cellule ce qu'ils font par diffusion passive et active. Certaines bactéries sont imperméables à la pénétration passive des aminosides. <b>Résistance acquise:</b> Le plus souvent médiée par un plasmide, les bactéries acquièrent la capacité d'inactiver l'antibiotique par adénylation, acétylation ou phosphorylation. d'autres cas, une mutation chromosomique peut modifier la sous-unité 30S du ribosome .
<b>Rifampicine</b>	Liée à une modification de la perméabilité de la bactérie ou à une modification de structure de l'enzyme cible l'ARN polymérase. Les résistances st uniquement d'origine chromosomique.
<b>Sulfamide</b>	Liée à une modification de la perméabilité de la bactérie ou à une modification de structure de la dihydroptéroate synthétase
<b>Vanco mycine</b>	la production d'un précurseur de peptidoglycane modifié, sur lequel la vancomycine ne peut pas se fixer.
<b>phénicolés</b>	Principalement par production d'une acétyltransférase qui inactive l'ATB (plasmidique) ou imperméabilité (chromosomique).

## LES ANTIBIOTIQUES EN PRATIQUE.

Pour qu'un antibiotique agisse, il faut que la bactérie y soit sensible (nécessaire mais pas suffisant). Il faut donc introduire des notions d'activité de l'antibiotique. Il y a donc des notions qualitatives et quantitatives.

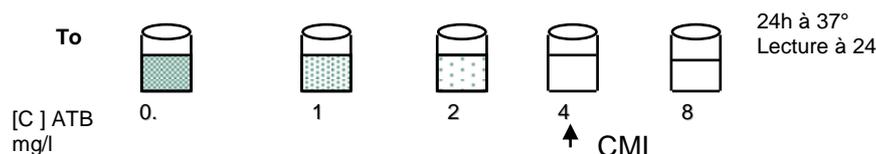
Qualitatives :- **sensibilité, résistant ou intermédiaire**

Quantitatives :- **CMI** (Concentration minimale inhibitrice)

### A. Mesure de l'activité d'un antibiotique : CMI

**CMI : la plus petite concentration qui inhibe toute culture visible** (on voit les bactéries à partir de  $10^5$  germes/ml) d'une souche bactérienne.

Pour calculer la CMI, on utilise un bouillon de culture avec la bactérie et plusieurs tubes avec des antibiotiques. On introduit dans le 1<sup>er</sup> tube une concentration de 0,5 mL d'antibiotique et on augmente dans les différents tubes cette concentration (+ un tube sans antibiotique). Puis on prend la bactérie et on les met dans chaque tube ( $10^4$  bactéries). Au bout de 24h à 37°, les tubes qui sont troubles ont eu une prolifération bactérienne, donc la bactérie n'est pas morte. A partir du tube de 4mL d'antibiotique, le bouillon n'est pas trouble donc la bactérie a été tuée. La CMI de cet antibiotique est donc de 4mg/L.



### B. Sensibilité et résistance

Une souche est dite sensible lorsqu'elle peut être atteinte par un traitement à dose habituelle par voie générale.

**(Concentrations sériques > CMI).**

Si on donne un antibiotique avec la CMI à 4 et que le pic est de 15mg/L et le taux résiduel de 5mg/L, cela veut dire que, dans le sang, le taux sera supérieur à la CMI (4mg/L). Cet antibiotique est sensible.

Une souche est dite résistante lorsqu'elle ne pourra pas être atteinte, quel que soit le type de traitement.

**(Concentration sérique < CMI).**

Si on donne un antibiotique avec la CMI à 4 et que le pic est de 1mg/L et le taux résiduel de 0,5mg/L. Cet antibiotique est résistant car, dans le sang, la concentration d'antibiotique n'est jamais supérieure à la CMI.

Une souche est dite intermédiaire lorsqu'elle peut être atteinte par un traitement local ou par une augmentation de la dose par voie générale ou encore grâce à une concentration physiologique particulière.

Si on donne un antibiotique avec la CMI à 4 et que le pic est de 6mg/L et le taux résiduel de 3mg/L, la concentration est un peu supérieure à la CMI. Il faut (si on peut car attention à la toxicité) augmenter la posologie pour atteindre 8. C'est un antibiotique intermédiaire.

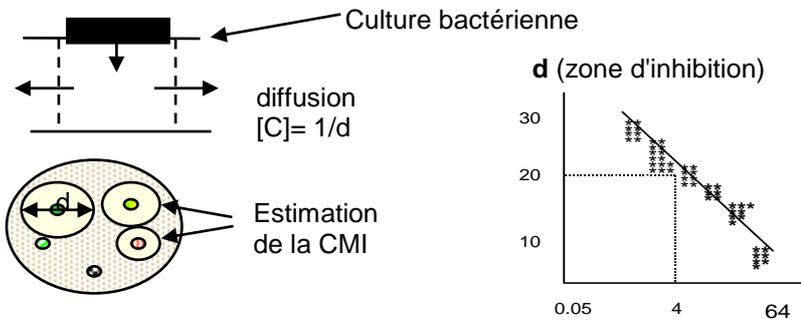
Si l'antibiotique n'a pas une concentration supérieure à la CMI dans le sang mais supérieure dans les urines (car s'élimine beaucoup), c'est aussi un intermédiaire. Par exemple, les aminosides s'éliminent beaucoup et on en retrouve en très grande quantité dans les urines, donc dans la vessie. Ils permettent donc de traiter des infections urinaires BASSES (là où il y a de l'urine, pas au niveau du rein où il y a du sang où la quantité est moindre).

### C. Antibiogramme et CMI

Comme on ne peut pas connaître toutes les CMI et les concentrations critiques (travail énorme) on utilise, en routine, des boîtes de pétri où l'on met des disques chacun imprégnés d'un antibiotique. L'antibiotique va se décharger sur la gélose à partir du centre, donc plus on s'éloigne du centre, plus la concentration de l'antibiotique diminue.

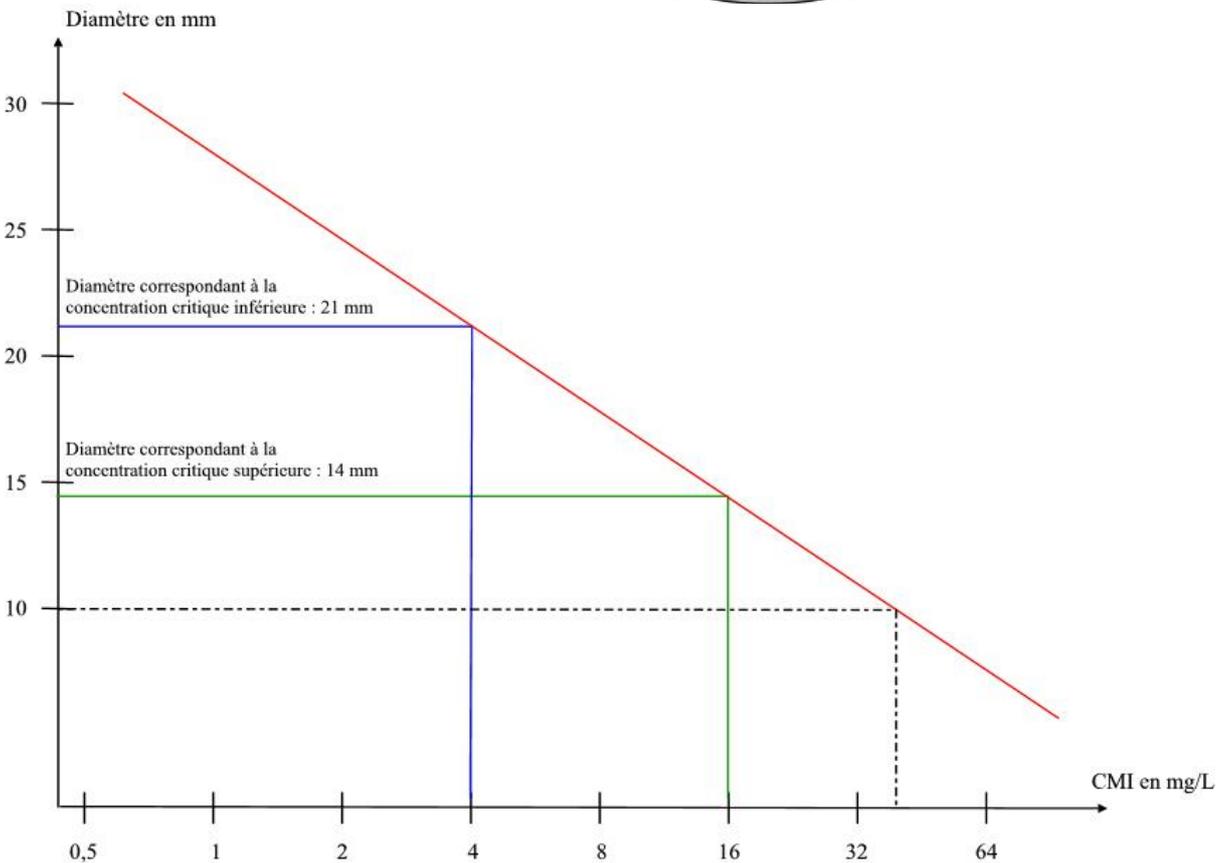
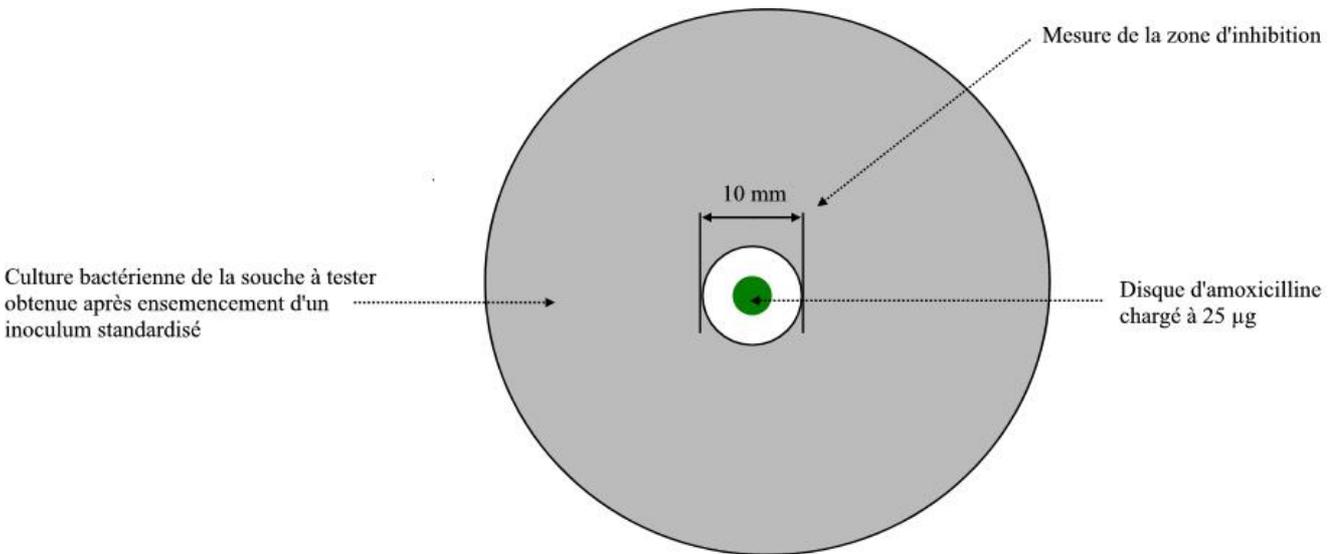
Si la bactérie pousse au contact du disque : la bactérie est résistante.

Si on voit à un moment un arrêt de la culture visible : la bactérie est sensible et on retrouve la définition (la plus petite concentration qui inhibe toute culture visible). On va alors mesurer le diamètre sans culture visible et on va comparer sur un graphique (donné par les fabricants) pour trouver la CMI correspondante. **C'est une estimation de la CMI.**

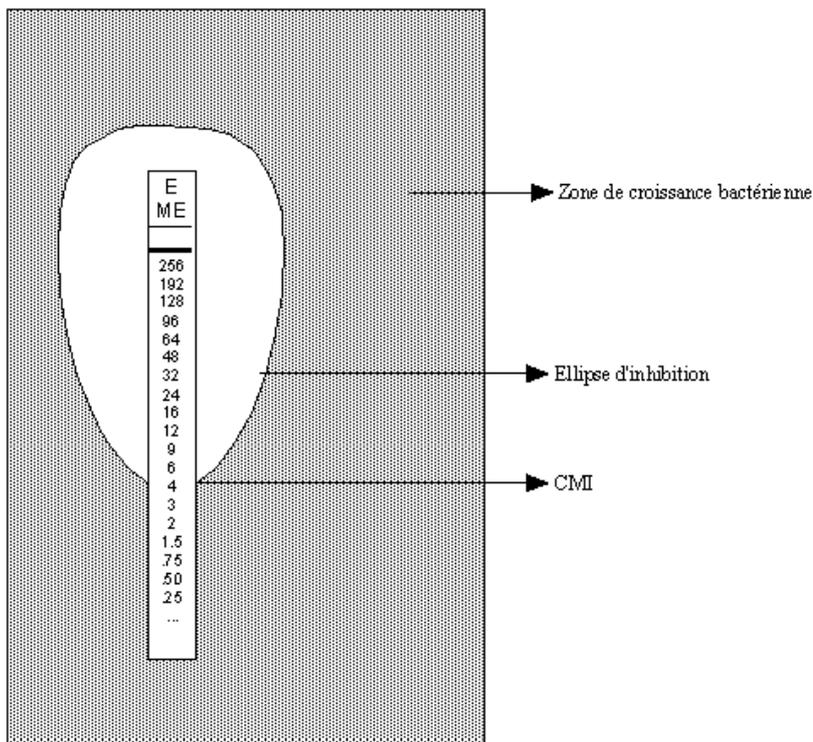


**D. Mesure précise de la CMI**

Dans certaines pathologies (comme la méningite), il faut avoir la CMI précise. On utilise la méthode de l'E-test. On utilise des bandelettes qui libèrent un gradient d'antibiotique dans le milieu et on mesure la vraie CMI.



Principe de la lecture d'un antibiogramme



*Principe du Etest®*

### **E. Les critères de choix des antibiotiques**

Le choix optimal d'un antibiotique dépend :

- De la sensibilité aux antibiotiques des bactéries responsables de l'infection,
- De la diffusion de l'antibiotique au niveau du site de l'infection,
- Des ATCDs du patient (Insuffisance Rénale...),
- De la toxicité de l'antibiotique,
- De l'Effet écologique,
- De l'expérience du clinicien,
- Du coût.

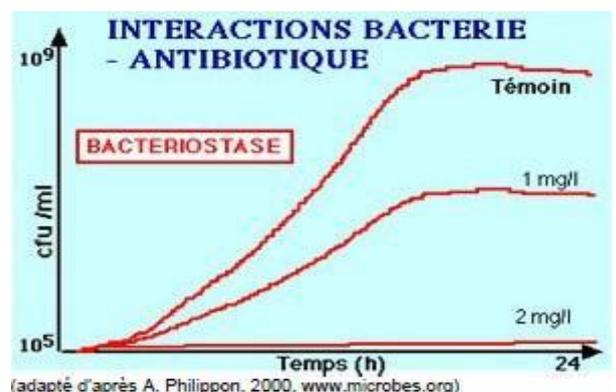
### **F. Le rôle du laboratoire**

- Faire l'antibiogramme,
  - Déterminer le type de résistance,
  - Calculer la CMI,
  - Calculer la CMB (Concentration minimale bactéricide  $\Rightarrow$  diminution de 4log de la concentration bactérienne avec l'antibiotique),
  - Effectuer le dosage des antibiotiques,
  - Faire des associations.

**Bactériostase** : C'est quand le nombre de bactéries viables après un temps d'incubation donné avec un antibiotique est inférieur au nombre observé sur un échantillon sans antibiotique.

On a donc un ralentissement voire arrêt de la croissance bactérienne, quantifiable par la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI, en mg/L)

**CMI** : C'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne, **les conditions de culture étant standardisées.** (concentration minimale pour laquelle la courbe est plate à droite)



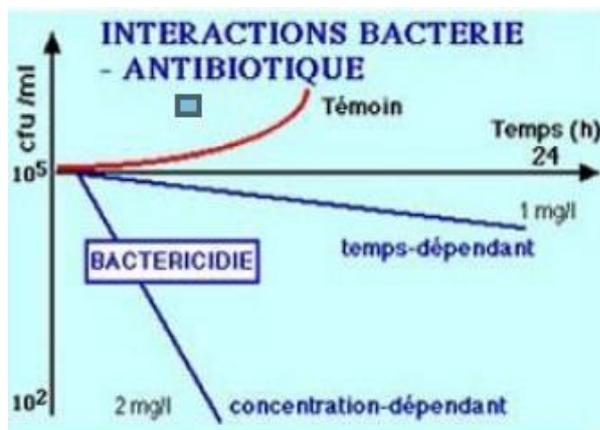
Si l'antibiotique n'a qu'une activité bactériostatique, le système immunitaire peut prendre en charge la bactérie affaiblie et finir de combattre l'infection, en revanche dans certains cas (plutôt des infections graves), on a besoin d'avoir un antibiotique bactéricide.

**Bactéricidie** : C'est quand le nombre de bactéries tuées après un temps d'incubation donné avec un antibiotique est inférieur à celui déterminé au temps  $T = 0$

On a donc un arrêt de la croissance **avec mortalité**, quantifiable par la Concentration Minimale Bactéricide (oui, CMB, en mg/L)

**CMB** : C'est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle l'effet bactéricide souhaité est de 99,99% les conditions de culture étant standardisées.

Il y a des antibiotiques dont l'action dépend de la concentration et d'autres dont l'action dépend du temps (en général leur action est plus lente que les antibiotiques concentration-dépendants)



adapté d'après A. Philippon, 2000, www.microbes.org)

## V. Surveillance d'un traitement ATB

### a) Surveillance clinique

- -efficacité du traitement : -régression de la fièvre, des signes généraux et focaux.
- -tolérance du traitement : -recherche d'effets secondaires des antibiotiques +++
- (allergie fréquente avec les Béta-lactamines)

- -arrêt immédiat de la perfusion ->prévenir d'urgence un médecin

### b) Surveillance bactériologique

- *Antibiogramme* : apprécie la bactériostase +++
- -mesure du diamètre d'inhibition de l'ATB <--> CMI de l'ATB
- Etude de l'efficacité des associations d'antibiotiques in vitro pour sélection de couples d'antibiotiques les + efficaces sur la bactérie visée par l'antibiothérapie
- **Attention : association synergique+++-**
- *association indifférente*
- *association antagoniste*
- *association additive*
- -Dosages sériques des antibiotiques effectués à des horaires précis +++ (pic et taux résiduel=vallée) indiqués dans l'insuffisance hépatique et rénale
- \*-+ contrôle de l'**efficacité** et de la **non toxicité** du traitement (risque rénal pour aminosides et vancomycine, risque auditif pour les aminosides)
- Série d'hémocultures sur résines (capteuses d'antibiotiques) après 48 h de traitement dans les infections graves (en particulier endocardites infectieuses).
- -à prélever avant une nouvelle injection d'antibiotique si hémocultures **positives** --> nouvel **antibiogramme** (évolution des résistances du germe impliqué dans l'infection?).

## Conclusion:

- Il y a de nombreux mécanismes de résistance.

Ces gènes de résistance peuvent être mobilisables et échangés, on peut avoir une modulation de l'expression de ces gènes qui peuvent être plus ou moins transcrits ou une modification par mutation.

- **Ces résistances sont en augmentation du fait de la pression de sélection par l'utilisation des antibiotiques sur les flores bactériennes.**

- **On a apparition de bactéries multirésistantes qui posent un problème en milieu hospitalier, entraînant des infections nosocomiales chez des patients affaiblis pour lesquels nous n'avons plus d'antibiotiques.**
- **Il faut réaliser un antibiogramme pour savoir quel antibiotique on peut utiliser.**
- **L'utilisation des antibiotiques doit être rationnelle.**
- **Il faut surveiller l'épidémiologie des bactéries résistantes aux antibiotiques.** Il a fallu rechercher des nouveaux agents antibactériens, ce qui signifie cribler les substances naturelles (pour cela, on est reparti sur des substances naturelles un peu négligées jusque-là), bloquer les mécanismes de résistance des bactéries aux antimicrobiens actuels, identifier de nouvelles cibles bactériennes (possible grâce à l'apport du génome bactérien).

**TOP-TEN des bactéries multi-résistantes (BMR) et BHR Bactéries hautement résistantes émergentes**

- 1) **SARM:** Staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) résistant à la méthicilline => R toutes B-lactamines
- 2) **PSDP et PRDP:** Pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) de sensibilité diminuée ou résistant à la pénicilline => I toutes B-lactamines
- 3) **BLSE:** bacille à Gram négatif (entérobactéries le plus souvent) producteurs de B-lactamase à spectre étendu -> R aux C3G
- 4) **MDR-TB:** bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) résistant à l'isoniazide et à la rifampicine
- 5) **Acinetobacter** (*A. baumannii*) résistant à l'imipénème
- 6) **Bacille pyocyanique** (*Pseudomonas aeruginosa*) résistant à tous les ATB sauf la colimycine
- 7) **GISA** Staphylocoque doré résistant aux glycopeptides (vancomycine et teicoplanine)
- 8) **EPC** entérobactéries productrices de carbapénémases **BHR**
- 9) **ERC** entérobactéries résistantes à la colistine **BHR**
- 10) **VRE:** entérocoque (*faecium*) résistant à la vancomycine (+teicoplanine) **BHR**

Bon Courage