

LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX ANTIBIOTIQUES, UN MODÈLE EXEMPLAIRE D'ÉVOLUTION MOLÉCULAIRE DIRIGÉE (1)

J.-M. GHUYSEN (2)

RÉSUMÉ : L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques dans le monde bactérien utilisent les mêmes stratégies et obéissent aux mêmes lois que l'évolution naturelle, mais de façon orientée et accélérée.

Pendant des siècles, les infections ont été un terrible fardeau pour l'humanité. A cause de leur caractère épidémique, elles ont terrorisé des communautés entières et réglé le sort des armées et le destin des nations. Entre 1347 et 1351, le tiers de la population de l'Europe médiévale a été éliminé par la peste bubonique. Il a fallu attendre un demi-millénaire pour apprendre qu'elle était due à une bactérie, *Yersinia pestis*. C'est en effet dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle que Pasteur découvrait le monde bactérien. L'identification des agents étiologiques spécifiques à un grand nombre d'infections a été un immense progrès pour la médecine.

Le concept de la chimiothérapie antibactérienne remonte à Paul Ehrlich et aux sulfamidés. Il a été établi définitivement par Fleming, Florey, Chain et la pénicilline. Utilisée pour la première fois à grande échelle en 1944 lors du débarquement des Alliés en Italie, la pénicilline a déclenché des efforts gigantesques de la part de la recherche académique et de l'industrie pharmaceutique. La moisson a été abondante. Nous disposons de plus de 100 molécules douées d'activité antibactérienne agissant au niveau de cibles différentes : la synthèse de la paroi, la synthèse de l'acide folique, la réplication de l'ADN, la transcription de l'ADN en ARN messenger et la synthèse des protéines. Cette marche glorieuse de la technologie devait assurer un contrôle absolu des calamités du passé. Elle a été acclamée comme un triomphe. En 1967, le *surgeon general* des Etats Unis, William Stuart, proclamait l'imminence de la victoire totale sur les maladies infectieuses d'origine bactérienne.

Ce bel optimisme n'est plus de mise. Au début des années cinquante, peu de temps après l'introduction de la pénicilline, de nombreux hôpitaux sont infestés de staphylocoques résistants. Ils produisent une β -lactamase qui dégrade la pénicilline en un métabolite biologiquement inactif, le pénicilloate. Toutefois, ces

BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS, AN EXEMPLARY MODEL OF ORIENTED MOLECULAR EVOLUTION

SUMMARY : The emergence and spread of antibiotic resistance among bacteria make use of the same strategies and obey the same laws as natural evolution but the process is oriented and accelerated.

KEY WORDS : *Bacterial resistance - Molecular evolution*

staphylocoques restent confinés aux milieux hospitaliers et, rapidement, la situation est à nouveau sous contrôle grâce au développement de β -lactamines semi-synthétiques peu sensibles aux β -lactamases, la méthicilline par exemple, et d'inactivateurs des β -lactamases, l'acide clavulanique par exemple.

Au début des années soixante, des colibacilles, des salmonelles et des shigelles capables de résister à plusieurs antibiotiques appartenant à des familles différentes apparaissent au Japon, en Amérique latine, en Europe et aux Etats Unis. Toutefois, ce problème est limité aux bactéries du tractus gastro-intestinal et, de l'avis général, il ne peut pas s'étendre à d'autres pathogènes.

Trente ans après, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique planétaire. Des souches pathogènes d'*Enterococcus faecalis*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Mycobacterium tuberculosis* responsables d'infections mortelles résistent à tous les antibiotiques connus. Des souches de *Shigella dysenteria* ne sont plus traitables que par les fluoroquinolones et des souches de *Staphylococcus aureus* ne sont plus traitables que par la vancomycine. En 1997, des staphylocoques résistants à la vancomycine ont été isolés à partir de trois patients géographiquement très éloignés les uns des autres. L'infection a pu être maîtrisée par d'autres antibiotiques, mais cet épisode montre que l'émergence de staphylocoques résistants à tous les antibiotiques, y compris la vancomycine, est en route. Une telle éventualité, si elle se réalise, sera une apocalypse écologique.

Cette situation est due à notre ignorance. Le début de la chimiothérapie antibactérienne remonte à une époque où les lois de la biologie moléculaire et de la biologie structurale restaient à découvrir. La structure en double hélice de l'ADN a été révélée par Watson et Crick en 1953 et il a fallu attendre une dizaine d'années supplémentaires pour que Werner Arber et les enzymes de restriction transforment le gène en objet chimique manipulable, et que John Kendrew, Max Perutz et la myoglobine dévoilent l'arrangement

(1) Lecture présentée le 25 avril 1998 à l'Académie Royale de Médecine de Belgique.

(2) Professeur Emerite, Université de Liège, Centre d'Ingénierie des Protéines.

spatial des atomes constitutifs d'une protéine. Or, c'est l'acquisition de ce savoir qui a donné l'outil dont on avait besoin pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'évolution.

Les bactéries ont un projet et un seul : se reproduire. Une bactérie peut, en quelques heures, donner naissance à une population qui contient plus de bactéries qu'il n'y a d'humains qui peuplent et ont peuplé la terre. Ce programme de vie est inscrit dans une banque de données. Un chromosome circulaire composé d'environ trois millions de caractères choisis parmi les quatre lettres A, T, C et G possibles, contient environ 4.000 gènes qui codent pour environ 4.000 protéines qui exécutent environ 4.000 tâches différentes. La réplication du chromosome s'opère à la vitesse de 2.000 caractères à la seconde avec une remarquable fidélité. Toutefois, il n'est pas immuable. Des mutations dues au hasard surviennent de façon inéluctable à une fréquence relativement élevée (10^{-7} à 10^{-9}) et une accumulation de changements ponctuels peut conduire, par le jeu de la sélection, à l'apparition de gènes nouveaux. Ces gènes sont conservés si les protéines nouvelles codées par ces gènes procurent un avantage à la bactérie porteuse en lui offrant une chance accrue de réaliser son projet, c'est-à-dire se reproduire, dans un milieu hostile.

Dans un monde où quelque 50.000 tonnes d'antibiotiques sont consommées annuellement, la pression sélective exercée sur le monde bactérien est énorme. Elle conduit à l'émergence de gènes de résistance grâce auxquels les bactéries modifient les "portes d'entrée" que l'antibiotique utilise pour atteindre la cible intracellulaire; actionnent des pompes d'efflux qui rejettent l'antibiotique à l'extérieur de la cellule; acquièrent des enzymes capables de dégrader l'antibiotique; et modifient des cibles normalement sensibles en des variantes que l'antibiotique ne reconnaît plus ou reconnaît mal. La résistance à la pénicilline est emblématique de ces deux derniers mécanismes.

Le peptidoglycane de la paroi bactérienne est une énorme molécule construite en forme de réseau : des chaînes de glycane substituées par des tétrapeptides sont reliées par des ponts interpeptidiques. Son assemblage s'opère à partir d'unités "disaccharide pentapeptide". Celles-ci sont transportées sur la face externe de la membrane cytoplasmique par un lipide particulier et elles se terminent par la séquence D-alanyl-D-alanine. A partir de ce précurseur, des glycosyl transférases assurent l'élongation des chaînes de glycane; des DD-transpeptidases assurent le pontage entre chaînes de glycane en fabriquant des liaisons interpeptidiques aux dépens des liai-

sons D-alanyl-D-alanine du précurseur; et des DD-carboxypeptidases déterminent le degré de pontage du peptidoglycane en hydrolysant, de façon contrôlée, les mêmes liaisons D-alanyl-D-alanine du précurseur.

DD-transpeptidases et DD-carboxypeptidases sont des acyl sérine transférases uniques au monde bactérien. Elles transfèrent le groupement carbonyl CO de la liaison peptidique CONH sensible sur un accepteur *via* la formation d'un "peptidyl enzyme" intermédiaire dans lequel la fonction CO forme une liaison ester avec le γ OH de la chaîne latérale de la "sérine active". Selon que l'accepteur de la réaction de transfert est un groupement aminé ou une molécule d'eau, ces acyl sérine transférases sont des enzymes de synthèse ou des enzymes de dégradation.

La liaison peptidique D-alanyl-D-alanine et la liaison amide du cycle β -lactamique de la pénicilline sont isostériques et, dès lors, la pénicilline se comporte comme un "substrat" des DD-peptidases. Toutefois, le flux de la réaction s'arrête au stade de l'intermédiaire "pénicilloyl enzyme", le centre catalytique des DD-peptidases est immobilisé et les bactéries, incapables d'assembler leur peptidoglycane pariétal, meurent par implosion osmotique.

Pour se protéger contre cette éventualité, les bactéries ont développé, probablement depuis des temps immémoriaux, d'autres acyl sérine transférases qui utilisent le même mécanisme catalytique que les DD-peptidases, mais ont acquis la propriété d'hydrolyser l'intermédiaire "pénicilloyl enzyme". Ce mécanisme de défense est extrêmement efficace. Une molécule de β -lactamase peut hydrolyser 1.000 molécules de pénicilline en pénicilloate par seconde.

DD-transpeptidases, DD-carboxypeptidases et β -lactamases dérivent d'une protéine ancestrale commune. Leurs propriétés différentes sont le résultat de l'adoption de changements structuraux locaux qui tout en affectant, parfois profondément, leurs séquences en acides aminés, ne modifient pas, essentiellement, leur structure tridimensionnelle. De façon invariable, le repliement de la chaîne polypeptidique a pour effet de rapprocher trois motifs (ou groupements d'acides aminés) présents de façon distante au niveau de la structure linéaire de la protéine. Ces trois motifs forment le centre catalytique dont la topologie est conservée et au sein duquel la "sérine active" occupe une position centrale. Les DD-transpeptidases, DD-carboxypeptidases et β -lactamases forment une superfamille de "pénicilloyl sérine transférases". Douées de personnalités multiples, elles illustrent le concept selon lequel l'évolution

obscurcit souvent la fonction. A ce niveau des investigations, l'angström, les règles qui gouvernent les relations structure-activité relèvent des méthodes de la chimie quantique.

Suite à l'utilisation massive des β -lactamines, l'évolution se poursuit devant nos yeux de façon accélérée et dirigée. Plus de cinquante variantes de la β -lactamase TEM-1, douées de spectres anti- β -lactamines différents, ont été identifiées. Toutes dérivent de l'enzyme "mère" par l'altération d'un nombre limité d'acides aminés. Utilisant la même stratégie, des DD-peptidases indispensables à la fabrication du peptidoglycane pariétal évoluent en des protéines variantes dont l'affinité pour la pénicilline est fortement diminuée, parfois négligeable. L'incidence de ce type de résistance parmi les staphylocoques, entérocoques et pneumocoques pathogènes augmentent de façon alarmante.

Aucun signe n'indique que les bactéries résistantes productrices de β -lactamases et/ou pourvues de DD-peptidases modifiées seraient moins aptes que les bactéries sensibles à se multiplier dans un monde où l'usage des β -lactamines serait exclu. La résistance à la pénicilline est, probablement, un chemin sans retour.

Le transfert de matériel génétique entre bactéries s'opère par différents moyens : la conjugaison au cours de laquelle une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice établissent un contact physique direct; la transformation par laquelle une bactérie "compétente" incorpore de l'ADN nu présent dans l'environnement; et la transduction au cours de laquelle l'ADN est véhiculé par un bactériophage.

L'incidence élevée de la résistance chez les bactéries pathogènes est due au fait qu'elles ont développé des systèmes de transfert d'ADN efficaces et à large spectre d'hôte. En plus de leur chromosome principal, les bactéries contiennent un ou plusieurs minichromosomes. Ces plasmides composés de quelques milliers de lettres seulement, ne sont pas indispensables, mais ils sont fort utiles. Ils sont doués de répllication autonome, ils peuvent s'intégrer dans le chromosome principal et en ressortir, ils peuvent transiter d'une bactérie à une autre par conjugaison et, souvent, ils contiennent des "intégrons" que l'on peut comparer à de véritables attrape-mouches tant est grande leur aptitude à capturer des gènes hétérologues, à les rassembler sous forme de cassettes et à les fonctionnaliser. Le mécanisme est ancien. Il est présent chez plusieurs espèces de *Vibrio* isolés en 1888, bien avant l'ère antibiotique. Aujourd'hui, les intégrons sont devenus des composants essentiels des plasmides de résistance. Plus de 40 cassettes porteuses de gènes de

résistance à plusieurs antibiotiques ont été identifiées. Des cassettes présentes chez des bactéries résistantes du cheptel bovin (dont la nourriture est "enrichie" en antibiotiques !) peuvent transiter vers des bactéries pathogènes de l'homme *via* des bactéries propres aux produits laitiers.

Nos connaissances sur le transfert d'information génétique entre organismes éloignés phyllogénétiquement sont récentes et, encore, parcelaires. Néanmoins, l'existence d'un flux de gènes des bactéries vers les plantes, les champignons et les cellules de mammifères, y compris humaines est un fait établi. Dans ce contexte, nombre de plantes transgéniques contiennent, intégrés dans leur chromosome, le transgène d'intérêt (conférant la résistance aux herbicides, par exemple) et un gène de résistance à un antibiotique, lequel a servi de marqueur lors de la construction du vecteur nécessaire à la transgénèse, mais est devenu sans utilité. De même que les transgènes pourraient migrer vers des espèces végétales proches par voie sexuée, les gènes de résistance aux antibiotiques pourraient "retourner" vers des bactéries par transfert horizontal d'ADN. Ce risque, estime Courvalin, a été examiné avec légèreté.

CONCLUSION

Le plus simple événement que l'on puisse concevoir au niveau du gène peut conférer une résistance efficace aux antibiotiques. Le monde bactérien se comporte comme un énorme organisme dont les cellules échangent leurs gènes avec facilité. Les occasions d'échanges de matériel génétique dans la nature sont, probablement, immenses. Ce savoir, dont la méconnaissance est aujourd'hui inexcusable, conduit à une conclusion importante. Les antibiotiques sont des médicaments sociétaux. Un gène de résistance apparu à un endroit du globe peut se propager loin et vite.

BIBLIOGRAPHIE

- Courvalin P.— Plantes transgéniques et antibiotiques. *Recherche*, 1998, **309**, 36-40.
- Goffin C, Ghuysen JM.— The multimodular penicillin-binding proteins : an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, submitted (1998).
- Levy SB.— The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*, March issue, 32-39 (1998).
- Multi-author review.— Bacterial resistance : the apocalypse. *Trends Microbiol*, 1994, **2**, 341-425.
- Multi-author review.— From peptidoglycan biosynthesis to resistance. *Cell Mol Life Sci*, 1998, **54**, 299-382.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J.M. Ghuysen, Centre d'Ingénierie des Protéines, Institut de Chimie B6, Sart Tilman, 4000 Liège.