Pathologie Biologie 60 (2012) e9–e14

Disponible en ligne sur ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Actualité biologique

Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences

The cost of antibiotic resistance: Analysis and consequences

I. Kempf*, S. Zeitouni

AFSSA LERAPP, unité mycoplasmologie-bactériologie, Zoopole-les-Croix, BP 53, 22440 Ploufragan, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 15 octobre 2009
Accepté le 27 octobre 2009

Mots clés :
Antibiorésistance
Coût biologique
Compensation
Réversibilité
Évolution
Persistence

Keywords:
Antimicrobial resistance
Biological cost
Compensation
Reversibility
Evolution
Persistence

RÉSUMÉ

La résistance aux antibiotiques, par mutation ou acquisition de gènes portés par des éléments génétiques mobiles, peut entraîner, pour une bactérie, une moindre compétitivité. Cette réduction de compétitivité s'évalue en comparant, en l'absence de l'antibiotique, le mutant résistant à la même souche sauvage sensible. Elle peut se traduire, par des différences de croissance in vitro ou de survie chez l'hôte ou dans l'environnement ou des différences de virulence. Divers travaux permettent d'objectiver ce coût biologique in vitro ou in vivo, dans différents systèmes d'étude. Toutefois, les bactéries peuvent souvent s'adapter et évoluer pour réduire ce coût biologique, par des mutations compensatoires ou par régulation de l'expression de la résistance par exemple. Cette compensation permet alors à la bactérie résistante de persister même après l'arrêt de l'utilisation des antibiotiques.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance, either by mutation or acquisition of resistance determinants harbored by mobile genetic elements, may confer a biological cost for the bacteria. This biological cost can be evaluated by comparing the resistant mutant to the wild susceptible strain, in the absence of antibiotic selection. This fitness cost can affect the growth rate in vitro or the survival in the host or in the environment or the virulence capacity. Various studies have evidenced this cost, either in vitro or in vivo, in different analysis models. However, bacteria can evolve and adapt to reduce this cost, by compensatory mutations or fine regulation of resistance expression. This compensatory evolution allows resistant bacteria to persist even in the absence of antibiotic selection pressure.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons…). Ces résistances peuvent conduire à une diminution du nombre d'options thérapeutiques, voire être à l'origine d'échecs thérapeutiques. Il est souvent espéré que l'arrêt ou la réduction de la consommation d'un antibiotique donné dans une population amène une réduction de la prévalence de la résistance à cet antibiotique mais tel n'est pas toujours le cas. Ainsi par exemple, il a été montré que des souches de *Escherichia coli* résistantes au triméthoprime et à la streptomycine pouvaient persister pendant plusieurs semaines dans un élevage de poulets en l'absence de pression de sélection [1]. En Suède, la surveillance de la résistance à la vancomycine chez *Enterococcus faecium* chez le poulet montre que la prévalence est passée de moins d'un pour mille en 2000, à plus de 40 % en 2005 alors qu'aucune pression de sélection n'est identifiée [2]. Chez l'homme, la réduction drastique de l'utilisation des sulfamides pour les infections urinaires en Angleterre à partir de 1995 au profit de l'utilisation du triméthoprime ne s'est pas accompagnée d'une réduction de la prévalence de la résistance aux sulfamides chez *E. coli*. Les raisons de cette évolution selon Bean et al. [3] consistent en un phénomène de co-sélection du gène *sul2* de résistance aux sulfamides par :

- l'utilisation d'autres antibiotiques dont les déterminants de résistance sont portés par les mêmes plasmides ;
- la mobilité du gène *sul2* ;
- l'absence de coût biologique lié au portage de ce gène.

Ces différents exemples indiquent que l'évolution des résistances aux antibiotiques ne dépend pas uniquement de la pression de sélection liée à leur utilisation, mais que d'autres facteurs

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : i.kempf@afssa.fr (I. Kempf).

0369-8114/$ – see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.patbio.2009.10.013

interviennent, et parmi eux le coût biologique de la résistance. La présente revue vise à définir ce coût biologique, décrire les modes d'évaluation in vitro ou in vivo, présenter les résultats rapportés pour diverses résistances chromosomiques ou acquises, et à analyser les conséquences cliniques de ce coût biologique.

2. Définition

L'acquisition d'une résistance à un antibiotique donné, soit par mutation, soit par acquisition de gènes d'origine exogène, est un événement favorable pour une population bactérienne car elle lui permet de se maintenir malgré la présence de l'antibiotique. Mais quand la pression de sélection liée à cet agent antimicrobien a disparu, cette modification du bagage génétique peut entraîner pour la bactérie, un coût biologique, c'est-à-dire une réduction de sa compétitivité ou « fitness ». En effet, il semble logique de penser que des modifications provoquant des résistances, survenant dans des gènes de ménage responsables de fonctions basiques telles que la synthèse de protéines, la construction de la paroi, certaines voies métaboliques, la réplication de l'ADN, ou encore la réponse générale au stress [4] risquent de dégrader des mécanismes dont l'efficacité est supposée optimale, puisque résultant de l'évolution du micro-organisme. L'acquisition de gènes de résistance au sein d'éléments génétiques supplémentaires ne devrait pas produire cet effet néfaste, mais suppose le plus souvent qu'une partie du métabolisme de la bactérie soit détournée au profit du portage ou de la multiplication de l'élément génétique supplémentaire (plasmides, transposons, intégrons…). Il semble donc en résulter une moindre compétitivité de la bactérie résistante. Cette réduction de compétitivité s'évalue, en absence de l'antibiotique, par rapport à la même souche sensible. Elle peut se traduire, par des différences de croissance ou de survie chez l'hôte ou dans l'environnement ou des différences de virulence [5], de cinétique d'élimination par l'hôte [6] ou de taux de transmission entre hôtes infectés. Ce coût biologique va déterminer la stabilité ou éventuellement la réversibilité de la résistance [7] au sein d'une population bactérienne.

3. Étude du coût biologique in vitro

3.1. Résistance chromosomique

L'analyse du coût biologique est souvent réalisée in vitro en comparant la croissance d'une souche sensible et de mutants isogéniques résistants dans un milieu sans antibiotique. Ainsi, Nilsson et al. [8] comparent les taux de croissance de souche d'*E. coli* uropathogènes, sensibles à la fosfomycine et de leurs mutants isogéniques résistants à cet antibiotique, obtenus in vitro, cultivés dans un milieu de culture ou dans l'urine. La croissance des mutants résistants est diminuée de 10 à 25 % en absence de fosfomycine. Selon Sandegren et al. [9], les mutants d'*E. coli* résistants au nitrofurantoïne, obtenus en une seule étape et présentant un faible niveau de résistance, ont un taux de croissance non significativement différent de celui des souches sensibles alors que les mutants obtenus en deux étapes et ayant un niveau de résistance plus élevé, ont une croissance ralentie de 1,4 % ou 3,1 % par rapport aux souches sensibles isogéniques. Les mêmes auteurs rapportent que des souches cliniques résistantes ont un taux de croissance significativement inférieur à celui de souches cliniques sensibles, mais il n'y a pas de corrélation entre les taux de croissance mesurés et les concentrations minimales inhibitrices observées. Les paramètres utilisés par Giraud et al. [10] pour caractériser des mutants de *Salmonella enterica serovar typhimurium* résistants aux fluoroquinolones sont le temps de génération, obtenu par le suivi de la densité optique à 600 nm lors de culture en milieu liquide, ou le délai de détection, défini comme étant le temps nécessaire pour atteindre une concentration de 10^6 UFC/ml lors d'un suivi de culture par impédancemétrie. Ce dernier délai dépend de la phase de latence et du temps de génération. Les résultats obtenus montrent que les mutants ont un temps de génération 1,4 à deux fois plus long que la souche parentale sensible, et des délais de détection plus élevés, ce qui conforte les observations antérieures de ces auteurs, montrant une taille réduite des colonies de mutants. Toutefois, la densité cellulaire obtenue pour les mutants lors de la phase stationnaire est identique à celle obtenue pour les souches parentales sensibles. La croissance de mutants résistants n'est toutefois pas toujours ralentie. Ainsi, selon Enne et al. [11], des mutants d'*E. faecium* résistants à la rifampicine ont une différence de taux de croissance de $-0{,}8 \pm 10{,}7$ % à $+31{,}4 \pm 11{,}1$ % par rapport aux souches parentales [11].

La différence de croissance entre souches sensibles et leur mutants résistants est aussi souvent analysée en mettant les deux souches en culture en compétition, à concentration identique au départ ; après incubation, le titre total de la culture est déterminé sur milieu sans antibiotique et la concentration en bactéries résistantes est obtenue sur milieux sélectifs. Le titre des bactéries sensibles est déduit par différence. Pour révéler de faibles différences de croissance, il est souhaitable de prolonger l'expérimentation en réalisant des passages successifs. Ce type d'expérimentation permet de calculer différents paramètres tels que :

- la compétitivité (« *fitness* ») relative d'un mutant à l'instant *t*, qui est le ratio du nombre de générations du mutant rapporté au nombre de générations de la souche sensible [12,13] ;
- l'index de compétition (IC) [14,15] (rapport entre nombre de bactéries mutantes et nombre de bactéries sensibles au temps *t* divisé par le même rapport au temps initial) ;
- le coefficient de sélection [15]. $S_t = [\ln R(t)/R(0)]/[g \times \ln(2)]$, avec R, ratio du nombre de mutants/nombre de sensibles, à l'instant 0 ou à l'instant *t*, et g le nombre de générations ;
- le coût par génération $CPG = 1 - e^{St}$ [16].

Ce type d'analyse permet à Enne et al. [11] d'évaluer le coût par génération de la résistance à la rifampicine de différents mutants d'*E. faecium* ; ce coût est estimé entre +2,5 % et −10 %, les doubles mutants présentant le coût le plus élevé. Pour le même antibiotique, des mutants de *Staphylococcus aureus* présentent une compétitivité relative de 0,60 à 0,98, le coût étant dans ce cas indépendant du niveau de résistance [13]. L'étude menée par Binet et Maurelli [14] s'intéresse au coût induit par des mutations dans l'ARNr 16S chez *Chlamydia psittacci* et responsables de résistance à la spectinomycine. Des mutations en position 1191 ou 1193 entraînent un coût élevé et la souche sensible surpasse rapidement les mutants résistants. Inversement, une mutation en position 1192 ne modifie pas fortement la compétitivité de la souche.

3.2. Résistances acquises

L'impact d'une résistance acquise peut également être étudié in vitro par comparaison des croissances de souche sensibles et des mêmes souches ayant acquis les éléments génétiques responsables de la résistance. Ainsi, Ender et al. [17] révèlent qu'une souche de *S. aureus* ayant acquis par transformation la cassette SCCmec de type I responsable de la résistance à la méthicilline, présente une croissance nettement ralentie avec un temps de génération de 40 ± 1 minutes comparé à 29 ± 1 minutes pour la souche sensible. L'expérience de compétition en milieu sans antibiotique entre souche résistante et souche sensible aboutit à la disparition de la souche résistante en quelques jours. Des variants de *S. aureus* à croissance rapide peuvent être obtenus mais leur niveau de sensibilité à la méthicilline est réduit. Selon Noto et al. [18], des souches de *S. aureus* possédant la cassette SCCmec et donc résistantes à la méthicilline

peuvent devenir résistantes à la vancomycine après différentes mutations lors de culture in vitro dans un milieu supplémenté en vancomycine, mais pour plusieurs lignées, la résistance à la vancomycine s'accompagne d'une perte du gène *mecA*. Ainsi, la résistance à la vancomycine entraîne un retard de croissance qui peut être partiellement compensé par la perte du gène *mecA*. Ce gène provoque donc un coût chez les souches de *S. aureus* sensibles ou présentant une résistance chromosomique à la vancomycine. Enfin, Foucault et al. [19] étudient le coût biologique de la résistance conférée par l'opéron VanA chez *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et montrent que, en absence de vancomycine, la croissance des transconjugants résistants aux deux antibiotiques n'est pas différente de celle de la souche sensible à la vancomycine. Toutefois, la culture en compétition de la souche sauvage de SARM et d'un transconjugant résistant à la vancomycine révèle un léger désavantage pour la souche doublement résistante.

Comme rapporté précédemment, en dépit d'une réduction drastique de l'utilisation des sulfamides en Angleterre, la prévalence de la résistance à ces antibiotiques est restée élevée chez *E. coli*. Enne et al. [20] rapportent que l'un des petits plasmides porteur de cette résistance et présent dans des isolats cliniques confère un avantage d'environ 4 % par génération aussi bien à sa souche d'origine qu'à une souche d'*E. coli* réceptrice JM109. L'impact de différents gènes de résistance portés par un plasmide ou des transposons est évalué par Enne et al. [21] in vitro en mettant en compétition une souche d'*E. coli* et la même souche ayant acquis un plasmide R46 avec un gène de résistance à l'ampicilline, ou des transposons Tn1 ou Tn7 porteurs de gènes de résistance pour l'ampicilline ou le triméthoprime respectivement. Le plasmide R46 entraîne une légère baisse de compétitivité d'environ −3 % par génération alors que l'insertion de Tn1 apporte un avantage de +6 % pour un des deux mutants, l'autre mutant porteur de Tn1 ou celui porteur de Tn7 se révélant aussi compétitif que la souche d'origine.

Il est possible également d'évaluer l'impact d'une résistance sur certaines propriétés d'une espèce bactérienne indispensables à son pouvoir pathogène (production de biofilms ou de protéases...), ou à ses possibilités de transmission (capacité à survivre dans l'eau ou dans l'environnement ou résistance au choc thermique [22,23]).

4. Étude du coût biologique in vivo

Le coût biologique peut également être analysé in vivo, soit chez l'hôte normal de la bactérie, soit sur des modèles expérimentaux. Ainsi, Bjorkman et al. [24] signalent, après des essais de compétition chez la souris entre souches sensibles et souches résistantes, que la plupart des mutants de *S. typhimurium* résistants à la streptomycine, la rifampicine ou l'acide nalidixique présentent, dans les organes du système réticuloendothélial (rate, foie), des titres très inférieurs à ceux de la souche sensible. Sun et al. [25] étudient la résistance à la colistine chez *S. enterica*, cette résistance étant due à des mutations dans les gènes *pmrA* et *pmrB* codant pour un système régulateur à deux composants induisant des modifications du core du LPS et du lipide A de la paroi. Ces mutations provoquent une légère réduction de la croissance in vitro des mutants mais leur croissance chez la souris ne paraît pas affectée. Un modèle d'infection urinaire chez la souris est utilisé par Lindgren et al. [26] et montre que les mutants d'*E. coli* résistants à la norfloxacine obtenus en une étape ne présentent pas de coût biologique in vivo, comme in vitro. Inversement, d'autres mutants, ayant accumulé plusieurs mutations, voient leur compétitivité nettement diminuée in vitro comme in vivo. Yu et al. [27] rapportent un modèle d'étude de biofilm chez la souris, analysé à l'aide d'imagerie par bioluminescence, ce qui leur permet de comparer une souche de *S. aureus* et ses mutants résistants à la rifampicine. Le mutant faiblement résistant semble mieux coloniser le cathéter que la souche sensible ou que le mutant hautement résistant. Paulander et al. [28] montrent que le modèle expérimental original que constitue le nématode *Caenorhabditis elegans*, peut être utilisé comme un modèle souris et ces auteurs comparent la compétitivité de mutants de *S. typhimurium* résistants à la streptomycine, la rifampicine, l'acide nalidixique, l'acide fusidique ou la mupirocine. Tous les mutants ont une moindre compétitivité que la souche sauvage sensible et les compétitivités relatives mesurées in vivo dans l'un ou l'autre modèle, sont plus faibles que celles mesurées in vitro. Inversement, Luo et al. [29] rapportent que certains mutants de *Campylobacter jejuni* résistants aux fluoroquinolones présentent une meilleure compétitivité que la souche sauvage chez leur hôte naturel, le poulet, et dans certains cas, le mutant résistant conduit à l'exclusion de la souche sensible après quelques jours. Enfin, Gustafsson et al. [30] inoculent la peau de volontaires humains avec une souche non épidémique de *Staphylococcus epidermidis* sensible, en compétition avec ses mutants résistants à la ciprofloxacine ou à l'acide fusidique et observent que la résistance à la ciprofloxacine ne semble pas affecter les propriétés de colonisation de la souche alors que la résistance à l'acide fusidique induit un retard de croissance in vitro et une perte très importante de compétitivité in vivo dans ce modèle.

Quelques auteurs analysent l'impact de la résistance sur les mécanismes de virulence des souches. Ainsi, Morosini et al. [31] décrivent l'impact de la présence du gène *ampC* chez *S. typhimurium* : la production de la bêta-lactamase AmpC s'accompagne d'une réduction des capacités d'invasion cellulaire et de réplication intra-cellulaire, en comparaison de la production d'une autre bêta-lactamase TEM-24. Parallèlement, Wang et al. [32] rapportent que la résistance aux quinolones chez cette même bactérie est associée à une réduction de l'expression de gènes de virulence tels que *invA* et *avrA*, et les mutants résistants se montrent moins invasifs, et se répliquent moins dans des cellules épithéliales et des macrophages.

Qu'il s'agisse de résistances acquises ou de mutations, la non observation d'un coût biologique ne signifie pas obligatoirement son absence. En effet, le manque de compétitivité peut être trop réduit pour être observable à l'échelle des expérimentations de laboratoire, mais peut se révéler suffisant sur le terrain pour permettre à la bactérie de persister. Et, comme nous l'avons vu, pour une résistance donnée, les conséquences peuvent être différentes, voire opposées en fonction des conditions expérimentales.

5. Mutations compensatoires et coévolution hôte–plasmides

Il est probable que, dans les cas où l'acquisition d'une résistance est obtenue sans coût biologique, voire dans certains cas, avec un avantage sur la souche sauvage, à l'arrêt de la pression sélective liée à l'antibiotique, les mutants résistants qui présentent une bonne compétitivité soient maintenus dans la population microbienne. Il serait illusoire de penser que l'inverse soit toujours vrai. En effet, dans le cas où la résistance induit initialement une perte de compétitivité pour une espèce bactérienne, s'il est rare qu'une réversion de la mutation entraînant la résistance se produise, le coût biologique causé par la résistance peut être réduit lors de passages successifs in vitro sur milieu sans antibiotique ou in vivo dans un environnement sans antibiotique. Ainsi, parmi 77 lignées obtenues in vitro à partir d'une souche de *S. typhimurium* résistante à la streptomycine et présentant un coût initial, seules quatre montrent un retour vers la sensibilité par réversion, toutes les autres lignées évoluent en acquérant des mutations compensatoires avec une fréquence d'au moins 10^{-7} par cellule par génération [33], une probabilité bien supérieure à celle de la

réversion. De même, Kugelberg et al. [34] étudient des mutants de *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux quinolones. Lors de passages successifs de ces mutants in vitro, des mutations compensatoires apparaissent avec une fréquence élevée et permettent de restaurer la compétitivité des mutants et l'activité de surenroulement de l'ADN par les topoisomérases. O'Neill et al. [35] montrent que, pour des mutants de *S. aureus* résistants à la rifampicine, la compétitivité d'un mutant présentant la substitution H481N dans le gène de la sous-unité β de l'ARN polymérase est de 0,80 mais peut être améliorée par une seconde mutation dans le même gène (S529L), qui non seulement permet d'atteindre une compétitivité de 0,99, mais augmente aussi le niveau de résistance. Lindgren et al. [26] sélectionnent par passages en série in vitro des mutants d'*E. coli* résistants aux fluoroquinolones. Le coût des mutants est analysé in vitro dans l'urine et dans un modèle d'infection urinaire chez la souris. Les auteurs observent que pour certaines lignées, le coût biologique, observé in vitro et in vivo pour les premières mutations, est ensuite diminué par de nouvelles mutations apparaissant lors des dernières multiplications. Les mutations compensatoires qui permettent de diminuer le coût d'une résistance peuvent se révéler différentes selon l'environnement dans lequel s'opère l'évolution : ainsi, chez *S. typhimurium* présentant une résistance à la streptomycine liée à une mutation dans le gène *rpsL*, l'évolution in vitro conduit à des mutations compensatoires extragéniques dans les gènes *rpsD* ou *rpsE*, alors que les mutants obtenus après adaptation chez la souris présentent une mutation intragénique [36]. Inversement pour *S. typhimurium* résistant à l'acide fusidique, l'adaptation amène préférentiellement des mutations intragéniques in vitro, mais souvent une vraie réversion chez la souris [36].

Les mécanismes mis en œuvre par les bactéries pour réduire le coût biologique d'une résistance sont variés. Paulander et al. [37] étudient la résistance à la mupirocine chez *S. typhimurium* et rapportent que le coût induit par les mutations dans le gène de l'isoleucyl-tRNA synthétase (*ileS*) peut être compensé par soit des mutations intragéniques, soit par une augmentation du nombre de copies du gène *ileS*, les deux phénomènes entraînant une amélioration de la cinétique d'aminoacylation de l'isoleucine et donc de la synthèse des protéines. Dans le cas des résistances acquises, il peut être observé une évolution de la relation bactérie–plasmide, permettant de réduire le coût du portage d'un plasmide particulier [38], après passages en séries in vitro. Une régulation fine de l'expression du gène de résistance peut être adoptée par la bactérie. Ainsi, Lenski et al. [39] comparent les modalités d'expression de la résistance à la tétracycline portée par le transposon Tn10 au sein d'un plasmide. Le mode inductible permet de réduire le coût de cette résistance en absence de sélection ; toutefois lors de la transition – présence de tétracycline, les souches inductibles peuvent être défavorisées par rapport aux souches ayant une expression constitutive, du fait du délai nécessaire pour l'induction de la résistance. De même, Foucault et al. [19] observent que, in vitro, pour un *S. aureus* résistant à la méthicilline, la résistance aux glycopeptides liée à l'opéron VanA, comporte un coût élevé pour la bactérie quand elle est induite, mais en absence d'induction, ce coût reste minime, en raison du niveau basal d'expression de l'opéron VanA régulé par le système à deux composants VanR-VanS. Chez *S. typhimurium*, la résistance aux céphalosporines liée à une production importante de céphalosporinases de type AmpC résultant de la présence du seul gène bla_{CMY-7} s'accompagne d'une réduction de la croissance de la souche et de sa capacité d'invasion cellulaire, mais ses propriétés sont restaurées, non par une régulation de l'expression du gène, mais par certaines fonctions du plasmide porteur de bla_{CMY-7} indiquant ainsi l'aptitude de cette espèce bactérienne à conserver sa virulence tout en acquérant une résistance inquiétante [40]. Un autre mécanisme mis en évidence par Enne et al. [41] chez *E. coli* est la capacité d'une bactérie d'empêcher l'expression des gènes de résistance portés par un plasmide qu'elle héberge. Cette « réduction au silence » est réversible et le plasmide transmis à une autre bactérie peut être de nouveau exprimé.

Une étude récente de Girgis et al. [42] décrit une méthodologie originale permettant de rechercher les mutations qui confèrent un avantage (ou un désavantage) à la bactérie *E. coli* lorsqu'elle est cultivée en présence d'une faible quantité d'antibiotique. L'utilisation d'une banque d'*E. coli* mutés par insertion de transposon permet de cibler les différentes mutations bénéfiques (ou défavorables) en fonction des familles d'antibiotiques testés, ces mutations permettant l'enrichissement de la culture par le clone porteur favorisé. L'analyse par micro-array permet ensuite de rechercher les gènes des clones sélectionnés qui sont sur- ou sous-exprimés. Par exemple, parmi 73 loci qui semblent apporter des mutations bénéfiques en présence d'aminoglycosides, sont retrouvés les gènes dont les produits sont impliqués dans la liaison aux quinones, la biosynthèse des ubiquinones et de la L-sérine, la glycolyse, l'activité de la cytochrome-c-oxydase, la réduction du nombre de radicaux libres libérés lors de la réaction de Fenton, le transport des aminoglycosides ou encore la réponse stringente.

6. Résistance, compensation et persistance

Une fois les mutations compensatoires acquises, le retour vers la sensibilité est improbable. En effet, selon Schrag [43], dans le cas d'*E. coli* résistant à la streptomycine, les mutations compensatoires empêchent le retour vers la sensibilité car la souche adaptée résistante devient plus compétitive que la même souche adaptée révertante. Cela explique la persistance de la résistance à la streptomycine dans certaines lignées ayant plus de 10 000 passages in vitro dans un milieu sans antibiotique.

Il existe toutefois certains exemples montrant que l'adaptation peut s'orienter vers la réduction ou la perte de la résistance, voire vers l'hypersensibilité. Ainsi, il a été observé pour des résistances aux macrolides ou au linezolide, que des mutations touchant les gènes d'ARNr qui sont présents en de multiples copies chez une même bactérie, peuvent être éliminées après conversion génique entre les copies sensibles et les copies résistantes du gène [44]. Par ailleurs, McCallum et al. [45] préparent des mutants de *S. aureus* résistants à la teicoplanine par passages successifs in vitro à partir d'une souche sensible. Ces mutants résistants ont une croissance ralentie, une paroi bactérienne épaissie, une augmentation de l'hémolyse et certains gènes de virulence sont réprimés. Un des mutants est analysé dans un modèle de cage tissulaire chez la souris. Dans trois cas sur sept, le mutant est éliminé. Cependant, lorsqu'il persiste, il récupère en partie les caractéristiques de la souche sauvage et, devient de plus, hypersensible à la teicoplanine, suggérant ainsi que la résistance à ce glycopeptide, constituant un fardeau pour *S. aureus*, est contre-sélectionnée in vivo, et que la compétitivité de la souche est restaurée au profit de la résistance. De même, Hurdle et al. [46] analysent des mutants de *S. aureus* résistants à la mupirocine obtenus in vitro. Les mutants obtenus en une seule étape et ayant des mutations dans le gène de l'isoleucyl-tRNA synthétase ne présentent pas de coût biologique, contrairement aux mutants obtenus en deux étapes. Pour ces derniers, le coût biologique peut être réduit par passages en milieu sans antibiotique, mais cette restauration de la compétitivité se fait aux dépens de la résistance alors que les mutations observées persistent. Enfin pour *Salmonella*, la compensation permettant de réduire le coût de la résistance à l'acide fusidique s'accompagne parfois d'une augmentation de la sensibilité vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques [47].

7. Coût biologique et conséquences cliniques

Les observations et études concernant le coût biologique de la résistance pour des bactéries pathogènes permettent de mieux comprendre l'évolution de la résistance de différentes espèces bactériennes vis-à-vis des molécules antibiotiques. Par exemple, un modèle mathématique prenant en compte la fréquence de mutation, la vitesse de croissance du mutant et la quantité d'urine présente dans la vessie, permet à Nilsson et al. [8] d'expliquer la rareté des infections urinaires à *E. coli* résistant à la fosfomycine. De même, Sandegren et al. [9] expliquent que la faible compétitivité des souches d'*E. coli* résistantes au nitrofurantoine associée à une croissance très perturbée en présence de l'antibiotique empêchent ces souches résistantes d'établir une infection dans la vessie. Inversement, il est fréquent d'observer que les souches cliniques résistantes sont celles qui portent les mutations dont le coût paraît le plus faible [35,48]. Wichelhaus et al. [13] rapportent que 91 % des souches cliniques de *S. aureus* résistantes à la rifampicine ont la mutation 481His->Asn, une mutation qui n'a pas de coût in vitro. Pour Sander et al. [16], les isolats cliniques de *Mycobacterium smegmatis* présentent des mutations trouvées les moins coûteuses dans les essais de compétition in vitro. De même, les souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la streptomycine portent les mutations qui n'infligent aucun coût chez *E. coli* ou *Salmonella* [49]. Selon Pfister et al. [50], le coût d'une même mutation A2058G de l'ARN23S qui entraîne la résistance aux macrolides est insignifiant pour les mycobactéries mais substantiel pour *Helicobacter pylori*. Cette différence de coût, liée à la nature des bases constituant la paire 2057-2611 de l'ARN23S, se retrouve en clinique et l'on constate que les mutants résistants des mycobactéries comportent le plus souvent les mutations A2058 et A2059 alors que chez *H. pylori*, la seconde mutation prédomine. L'analyse du coût de la résistance à la clarithromycine pour *H. pylori* est effectuée par Bjorkholm et al. [51] qui observent que, chez la souris, le mutant résistant est rapidement éliminé au profit de la souche sensible, suggérant une perte ou une réduction des capacités de colonisation, mais aucune différence des propriétés d'adhésion du mutant au tissu stomacal ou de résistance à l'acide ne peuvent être mises en évidence. Toutefois, pour deux tiers des paires d'isolats de *H. pylori* obtenues chez des patients traités, les tests effectués chez la souris montrent que le coût peut être réduit, ce qui permet une stabilisation de la population résistante qui s'impose après 40 à 120 jours. Enfin, l'évolution de la résistance à l'isoniazide des souches de *M. tuberculosis* est particulièrement illustratrice de l'impact du coût biologique : la résistance est liée à une mutation dans le gène *katG* qui aboutit à la perte de l'activité catalase et à la non virulence des souches. Toutefois, la majorité des isolats résistants portant cette mutation contiennent également une mutation au niveau du promoteur du gène *ahpC*, conduisant à une élévation de la production de l'alkylhydroxyperoxydase réductase, ce qui compense la perte de la catalase et restaure la virulence [49].

8. Conclusion

Si l'évolution de la résistance dans une population dépend de l'utilisation des antibiotiques et de la vitesse d'émergence de mutants résistants, le coût biologique et les possibilités de compensation de ce coût sont des éléments primordiaux pour la stabilisation et la persistance de la résistance. Les expérimentations et la modélisation suggèrent que, dans une population soumise à des goulots d'étranglement (lors de transmission d'hôte à hôte par exemple), ou située dans certains compartiments tissulaires, des mutants de moindre compétitivité peuvent dominer si leur taux d'apparition est plus élevé que celui de révertants sensibles de compétitivité optimale [7,52], mais au sein d'une large population, les mutants les plus compétitifs seront sélectionnés. Il est alors à craindre que l'absence de coût ou la réduction du coût biologique d'une résistance puissent être telles qu'une fois établie dans une population, cette résistance soit maintenue pendant très longtemps même après l'arrêt de l'utilisation de l'antibiotique [3,53]. Il est donc capital de tenir compte de ce phénomène dans nos politiques d'usage des antibiotiques. Il serait également souhaitable que le coût biologique d'une résistance et son éventuelle compensation soient analysés lors de l'évaluation de nouvelles molécules, voire dès leur conception. Ainsi, la connaissance des gènes ou des voies métaboliques qui permettent à la bactérie de réduire la gêne occasionnée par un mécanisme de résistance [42] pourrait être la source d'innovations thérapeutiques susceptibles de prolonger l'efficacité des antibiotiques.

Références

[1] Chaslus-Dancla E, Gerbaud G, Lagorce M, Lafont JP, Courvalin P. Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. Antimicrob Agents Chemother 1987;31:784–8.

[2] Nilsson O, Greko C, Top J, Franklin A, Bengtsson B. Spread without known selective pressure of a vancomycin-resistant clone of *Enterococcus faecium* among broilers. J Antimicrob Chemother 2009;63:868–72.

[3] Bean DC, Livermore DM, Hall LMC. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:1088–93.

[4] Macvanin M, Bjorkman J, Eriksson S, Rhen M, Andersson DI, Hughes D. Fusidic acid-resistant mutants of *Salmonella enterica serovar typhi murium* with low fitness in vivo are defective in RpoS induction. Antimicrob Agent Chemother 2003;47:3743–9.

[5] Martinez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 2002;15:647–79.

[6] Bjorkman J, Andersson DI. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. Drug Resist Updat 2000;3:237–45.

[7] Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. Curr Opin Microbiol 2003;6:452–6.

[8] Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2850–8.

[9] Sandegren L, Lindqvist A, Kahlmeter G, Andersson DI. Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2008;62:495–503.

[10] Giraud E, Cloeckaert A, Baucheron S, Mouline C, Chaslus-Dancla E. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica serovar typhi murium*. J Med Microbiol 2003;52:697–703.

[11] Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother 2004;53:203–7.

[12] Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. Am Nat 1991;138:1315–41.

[13] Wichelhaus TA, Boddinghaus B, Besier S, Schafer V, Brade V, Ludwig A. Biological cost of rifampin resistance from the perspective of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3381–5.

[14] Binet R, Maurelli AT. Fitness cost due to mutations in the 16S rRNA associated with spectinomycin resistance in *Chlamydia psittaci* 6BC. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4455–64.

[15] Pranting M, Negrea A, Rhen M, Andersson DI. Mechanism and fitness costs of PR-39 resistance in *Salmonella enterica serovar typhi murium* LT2. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2734–41.

[16] Sander P, Springer B, Prammananan T, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, et al. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1204–11.

[17] Ender M, McCallum N, Adhikari R, Berger-Bachi B. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2295–7.

[18] Noto MJ, Fox PM, Archer GL. Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, mecA, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1221–9.

[19] Foucault ML, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Fitness cost of VanA-type vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2354–9.

[20] Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LMC. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. J Antimicrob Chemother 2004;53:958–63.

[21] Enne VI, Delsol AA, Davis GR, Hayward SL, Roe JM, Bennett PM. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. J Antimicrob Chemother 2005;56:544–51.

[22] Sanchez P, Linares JF, Ruiz-Diez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, et al. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. J Antimicrob Chemother 2002;50:657–64.
[23] Han F, Pu S. Fitness cost of macrolide resistance in Campylobacter jejuni. Int J Antimicrob Agents 2009;34:462–6.
[24] Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhi murium*. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:3949–53.
[25] Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson DI. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica serovar typhi murium*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2298–305.
[26] Lindgren PK, Marcusson LL, Sandvang D, Frimodt-Moller N, Hughes D. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2343–51.
[27] Yu J, Wu J, Francis KP, Purchio TF, Kadurugamuwa JL. Monitoring in vivo fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. J Antimicrob Chemother 2005;55:528–34.
[28] Paulander W, Pennhag A, Andersson DI, Maisnier-Patin S. *Caenorhabditis elegans* as a model to determine fitness of antibiotic-resistant *Salmonella enterica serovar typhi murium*. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:766–9.
[29] Luo N, Zhang Q, Naidan L, Sonia P, Orhan S. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant Campylobacter jejuni in the absence of antibiotic selection pressure. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:541–6.
[30] Gustafsson I, Cars O, Andersson DI. Fitness of antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* assessed by competition on the skin of human volunteers. J Antimicrob Chemother 2003;52:258–63.
[31] Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martinez JL, Blazquez J. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica serotype typhi murium*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3137–43.
[32] Wang YP, Li L, Shen JZ, Yang FJ, Wu YN. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes invA and avrA, growth and intracellular invasion and survival. Vet Microbiol 2009;133:328–34.
[33] Maisnier-Patin S, Berg OG, Liljas L, Andersson DI. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhi murium*. Mol Microbiol 2002;46:355–66.
[34] Kugelberg E, Lofmark S, Wretlind B, Andersson DI. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2005;55:22–30.
[35] O'Neill AJ, Huovinen T, Fishwick CWG, Chopra I. Molecular genetic and structural modeling studies of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase and the fitness of rifampin resistance genotypes in relation to clinical prevalence. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:298–309.
[36] Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. Science 2000;287:1479–82.
[37] Paulander W, Maisnier-Patin S, Andersson DI. Multiple mechanisms to ameliorate the fitness burden of mupirocin resistance in *Salmonella typhi murium*. Mol Microbiol 2007;64:1038–48.
[38] Bouma JE, Lenski RE. Evolution of a bacteria/plasmid association. Nature 1988;335:351–2.
[39] Lenski RE, Souza V, Duong LP, Phan QG, Nguyen TNM, Bertrand KP. Epistatic effects of promoter and repressor functions of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli*. Mol Ecol 1994;3:127–35.
[40] Hossain A, Reisbig MD, Hanson ND. Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of *Salmonella typhi murium*. J Antimicrob Chemother 2004;53:964–70.
[41] Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3003–10.
[42] Girgis HS, Hottes AK, Tavazoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. PLoS ONE 2009;4:1–13.
[43] Schrag SJ, Perrot V, Levin BR. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1997;264:1287–91.
[44] Andersson DI. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? Curr Opin Microbiol 2006;9:461–5.
[45] McCallum N, Karauzum H, Getzmann R, Bischoff M, Majcherczyk P, Berger-Bachi B, et al. In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2352–60.
[46] Hurdle JG, O'Neill AJ, Ingham E, Fishwick C, Chopra I. Analysis of mupirocin resistance and fitness in *Staphylococcus aureus* by molecular genetic and structural modeling techniques. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4366–76.
[47] Macvanin M, Hughes D. Hyper-susceptibility of a fusidic acid-resistant mutant of *Salmonella* to different classes of antibiotics. FEMS Microbiol Lett 2005;247:215–20.
[48] Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I. The isoleucyl-tRNA synthetase mutation V588F conferring mupirocin resistance in glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* is not associated with a significant fitness burden. J Antimicrob Chemother 2004;53:102–4.
[49] Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol 1999;2:489–93.
[50] Pfister P, Corti N, Hobbie S, Bruell C, Zarivach R, Yonath A, et al. 23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058Aâ†'G. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:5180–5.
[51] Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:14607–12.
[52] Levin BR, Perrot V, Walker N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. Genetics 2000;154:985–97.
[53] Johnsen PJ, Simonsen GS, Olsvika, Midtvedt T, Sundsfjord A. Stability, persistence, and evolution of plasmid-encoded VanA glycopeptide resistance in enterococci in the absence of antibiotic selection in vitro and in gnotobiotic mice. Microb Drug Resist 2002;8:161–70.