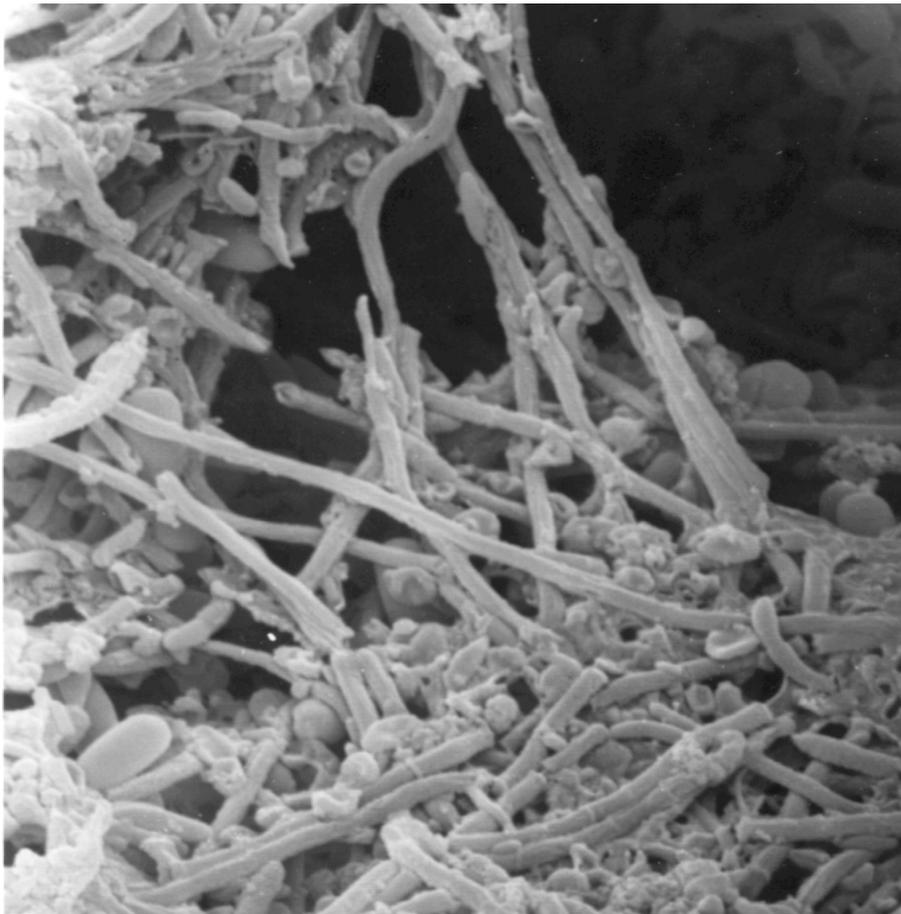


Recherche de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques **dans les biofilms**

- Li Zhang and Thien-Fah Mah. 2008. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology* **190** : 4447-4452.

- Sünje Johanna Pamp, Morten Gjermansen, Helle Krogh Johansen, and Tim Tolker-Nielsen. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Molecular Microbiology* **68** : 223-240.



Rémy Bonnin

Clémence Collet

Tuteur : Christophe Beloin

Résumé

Des bactéries, attachées à une surface et enveloppées dans une matrice, forment un biofilm. Ce mode de vie permet aux bactéries de résister à un grand nombre de stress, et notamment aux antibiotiques. Il existe de nombreux mécanismes de résistance, dont les pompes à efflux RND. Les deux articles qui suivent étudient particulièrement ces phénomènes. Le premier s'attache à caractériser l'une de ces pompes dans des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et le deuxième étudie le mécanisme de résistance à un antibactérien particulier, la colistine, lié à une pompe à efflux dans une population particulière du biofilm.

Introduction

Un biofilm est une communauté hétérogène de bactéries agrégées en microcolonies, entourées par une matrice et adhérentes à une surface inerte ou biologique (Drenkard *et al*, 2003). On en retrouve sur la plupart de surfaces animales, végétales et minérales. Contrairement aux idées reçues, les biofilms sont le mode de vie normal des bactéries (Klinger *et al*, 2005) et les recherches sur les bactéries devraient donc se concentrer sur ce type de structure plutôt que sur les formes planctoniques. En effet, les problèmes générés par les biofilms sont nombreux et touchent différents domaines. Bien évidemment le secteur hospitalier est le plus touché, les biofilms causent de nombreuses pathologies nosocomiales notamment lors d'interventions invasives (prothèse, cathéters...). Mais ils sont également un problème pour l'industrie où ils entraînent la dégradation des installations. Le problème majeur avec cette forme de vie est qu'elle confère une résistance importante à différents stress : UV, toxicité de métaux, dessiccation, déplétion en nutriment et surtout aux antibiotiques (Costerton *et al*, 1999). La résistance aux antibiotiques est, bien sûr, particulièrement étudiée et de nombreux mécanismes ont été mis en évidence : difficulté de la pénétration de l'antibiotique dans le biofilm (pas pour tous), croissance ralentie d'une partie du biofilm, hétérogénéité des populations présentes et diversité génétique, modification du phénotype par induction de certains gènes de résistance. Mais il reste encore de nombreux mécanismes mal compris. C'est le cas des pompes à efflux, très importantes pour la résistance aux antibiotiques, notamment chez *Pseudomonas aeruginosa*. Les deux articles étudiés s'attachent à comprendre le fonctionnement de ce type de mécanisme particulier.

Participation d'un nouveau système d'efflux dans la résistance aux antibiotiques spécifique aux biofilms :

L'étude de la résistance aux antibiotiques des formes planctoniques bactériennes a mis en évidence deux mécanismes d'efflux des antibiotiques : les pompes RND (resistance-nodulation-division) et les ABC (ATP-binding cassette) transporteurs. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, neuf pompes RND ont déjà été identifiées et caractérisées comme mécanisme de résistance des formes planctoniques. Il a donc été suggéré qu'elles jouaient également un rôle dans la résistance aux antibiotiques des biofilms. Les auteurs ont alors recherché des mutants obtenus par insertion du transposon Tn5 ne développant pas l'augmentation caractéristique de la résistance aux antibiotiques quand ils poussent sous forme de biofilm, dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance.

Un screen génétique a été réalisé et un mutant, dans lequel Tn5 s'est inséré dans un opéron putatif de quatre gènes PA1874, 1875, 1876 et 1877, a été sélectionné. Ces gènes sont annotés comme codant pour des protéines membranaires, des protéines homologues à une pompe RND ou encore des protéines appartenant à un ABC transporteur.

Des mutants par insertion de chacun des quatre gènes ont été obtenus. Sous forme de biofilms, ces mutants présentent tous une sensibilité accrue à la tobramycine, en comparaison avec le sauvage, chez qui la tolérance à la tobramycine est observée uniquement chez les formes biofilm et pas chez les formes planctoniques. Mais lorsque les mutations sont obtenues par délétion en phase, le mutant KO 1874 présente une résistance identique à celle du sauvage, le phénotype était dû à un effet polaire de l'insertion du transposon, cette protéine n'intervient donc pas dans la résistance, contrairement aux trois autres.

Lorsque que l'on délète l'opéron en entier et que l'on teste la résistance à différents antibiotiques, le mutant présente une sensibilité deux à trois fois plus importante pour la tobramycine, la gentamicine et la rifampine. PA1874-1877 n'est donc pas un mécanisme spécifique à un antibiotique ou à une classe d'antibiotique. Il a également été montré que la perte de l'opéron entraîne une accumulation de tobramycine dans les mutants. La mutation a donc un effet sur l'aptitude à rejeter les antibiotiques hors de la cellule, cela confirme l'annotation des produits de l'opéron comme transporteurs.

Des expériences de RT-PCR semi quantitative ont mis en évidence que le gène 1874 était exprimé dix fois plus dans les biofilms que dans les formes planctoniques (Figure 1). La délétion de l'opéron touche donc un mécanisme de résistance spécifique aux biofilms car cet opéron est préférentiellement exprimé dans ceux-ci. De plus si on clone ces gènes dans un plasmide sous un promoteur inductible, les bactéries cultivées sous forme planctonique avec ce plasmide sont moins sensibles aux antibiotiques que les bactéries ayant reçu le plasmide vide. Ceci explique donc pourquoi, seules les formes biofilms résistent à la tobramycine.

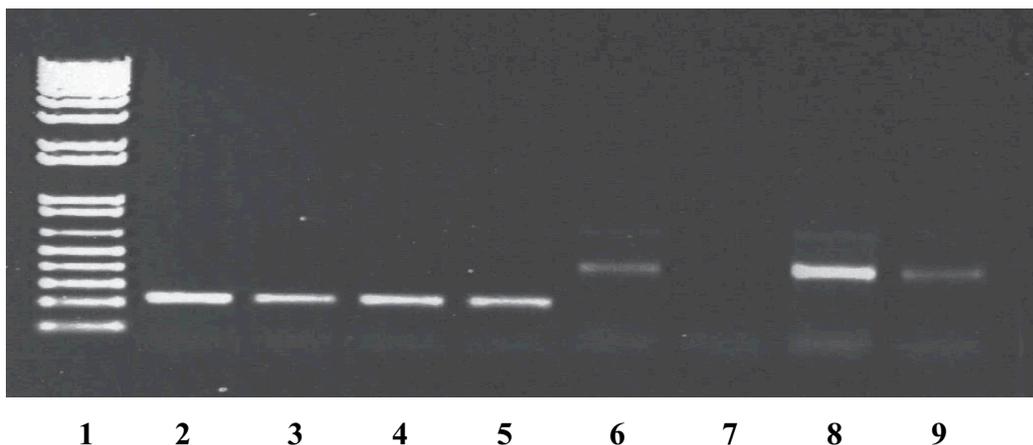


Figure 1 : Analyse de l'expression du gène PA1874 par RT-PCR.

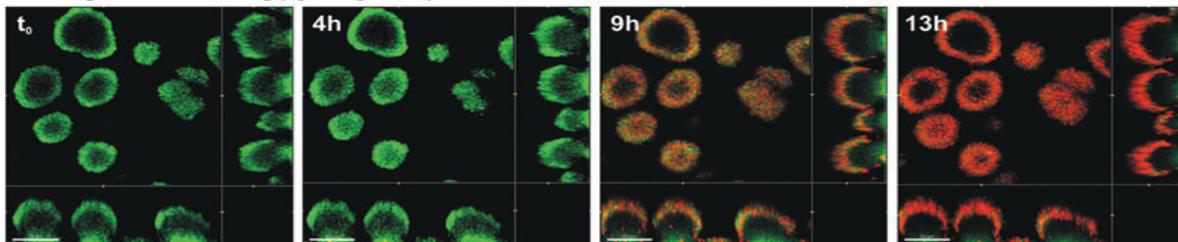
L'expression du gène dans les formes planctoniques (6 et 7) et dans un biofilm (8 et 9) de *Pseudomonas aeruginosa* a été mesurée par RT-PCR avec des primers spécifiques du gène PA1874 (6 à 9) et du gène *rpoD* contrôle (2 à 5). Les ARN ont été extraits des formes planctoniques et biofilms et utilisés purs (2, 4, 6 et 8) ou dilués au 1/10 (3, 5, 7 et 9).

Les auteurs ont donc mis en évidence un nouveau système d'efflux spécifique aux biofilms chez *P. aeruginosa* contribuant à la résistance à plusieurs antibiotiques.

Rôles des cellules actives dans la tolérance aux antibiotiques dans les biofilms

Dans cet article, les auteurs étudient la résistance à la colistine d'un biofilm. Ils souhaitent prouver que cette résistance est liée, dans une sous population de cellules métaboliquement actives, à un mécanisme utilisant une pompe à efflux. Cet article est basé sur la microscopie confocale avec un double marquage fluorescent avec un couplage GFP à différents promoteurs et un autre marquage à l'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN. Il n'entre dans la cellule que si la membrane est altérée : c'est un donc un marqueur de la viabilité cellulaire. Il existe deux types de cellules dans biofilm : des cellules métaboliquement actives en périphérie et des cellules peu actives en profondeur du biofilm. Il a été montré que seules certaines populations du biofilm sont résistantes à la colistine (Søren Molin et al 2008), qui est un peptide cationique antimicrobien de la famille des polymyxines. Ce peptide crée des pores dans la membrane au niveau du LPS, grâce aux gènes de l'opéron *pmr* qui synthétisent un lipopolysaccharide modifié par addition d'aminoarabinose.

A *P. aeruginosa* *rrnBP1-gfp*[AGA] + ciprofloxacine



B *P. aeruginosa* *rrnBP1-gfp*[AGA] + colistine

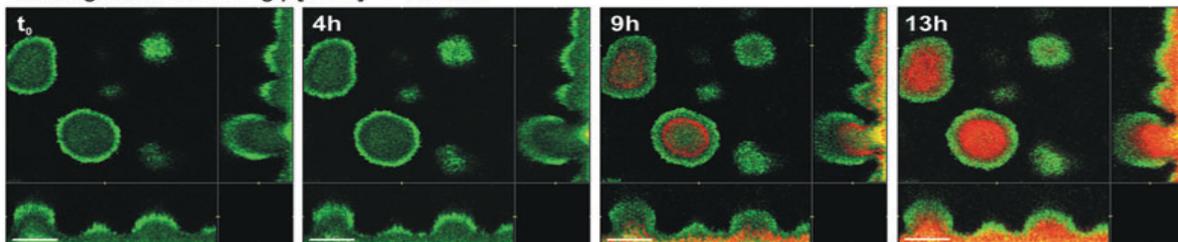


Figure 2: Ciblage des populations distinctes dans un biofilm par utilisation de GFP-AGA(GFP instable) et traitement à la ciprofloxacine et à la colistine.

Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* de 4 jour sont traités avec de la colistine et de la ciprofloxacine. Les cellules vivantes apparaissent en vert grâce à l'expression de la GFP et les cellules mortes, en rouge à cause de l'iodure de propidium. La ciprofloxacine agit sur les cellules périphériques, alors que la colistine tue uniquement les cellules du substratum.

L'étude de la résistance à la colistine sur *Pseudomonas aeruginosa* a débouché sur la découverte de pompes à efflux qui permettraient une tolérance à ce peptide antimicrobien et à divers autres antibiotiques. Les bactéries en périphérie sont métaboliquement très actives alors que les bactéries du substratum le sont peu (SUCI et al 1994). Dans cet article, les auteurs utilisent une GFP modifiée, qui se dégrade de manière rapide et dont l'expression dépend d'un promoteur induit uniquement dans les cellules métaboliquement actives, qui apparaissent donc en vert. Si on compare l'état d'activité avec la résistance aux antibiotiques, on ne voit l'effet de la colistine que sur les cellules dans le substratum donc peu actives (figure 2B). Par contre l'action d'une quinolone de troisième génération, la ciprofloxacine, se voit uniquement sur les cellules de la périphérie donc métaboliquement active (figure 2A). La ciprofloxacine, comme toutes les quinolones, agit

sur la réplication de l'ADN bactérien au niveau de l'ADN gyrase et donc touche indirectement les cellules actives. La double action de la ciprofloxacine et de la colistine détruit complètement le biofilm (figure 2).

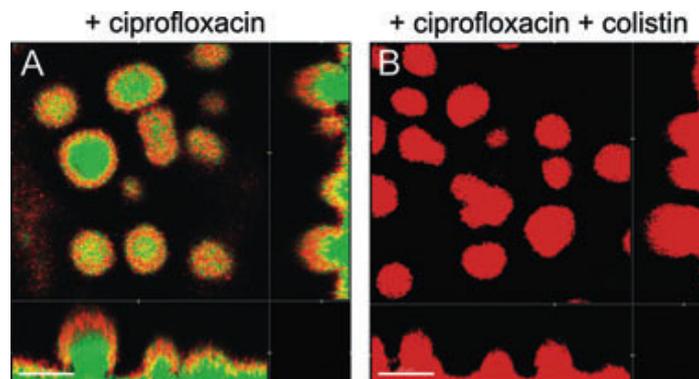


Figure 2 : Distribution des cellules vivantes et mortes par le double usage de la ciprofloxacine et de la colistine. Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* de 4 jours sont traités avec de la colistine et de la ciprofloxacine. Les deux antibiotiques combinés détruisent entièrement le biofilm.

Les auteurs ont ensuite cherché à démontrer qu'un mécanisme utilisant une pompe à efflux était lié à ce phénotype de résistance à la colistine dans les bactéries de la périphérie. Pour cela, un biofilm a été traité avec un inhibiteur de la force protomotrice : le CCCP. Ce traitement bloque les pompes utilisant la force protomotrice comme énergie. La figure 3 montre l'effet du CCCP et colistine sur le biofilm. Le biofilm est détruit entièrement.

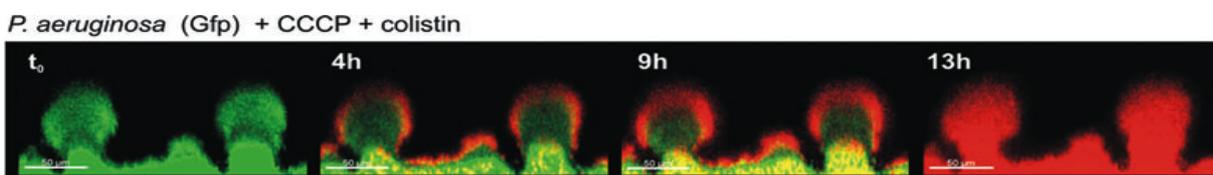


Figure 3 : Biofilm exposé à un inhibiteur de la force protomotrice CCCP et à de la colistine. L'action combinée de deux traitements tue toutes les cellules du biofilm.

Une pompe à efflux est donc bien liée à cette résistance : il s'agit d'une pompe MexAB-oprM. La délétion des gènes codant pour cette pompe, induit par l'ajout de colistine, entraîne la perte de la tolérance à cet antibiotique. Cette pompe est de la famille RND, ses substrats peuvent être multiples et elle utilise le gradient de force protomotrice comme énergie.

Un nouveau mécanisme de résistance impliquant une pompe à efflux a donc été mis en évidence dans une population particulière du biofilm. Les auteurs ont montré que la tolérance observée était en fait une combinaison du rôle de la pompe MexAB-OprM et de l'opéron *prm*, qui modifie la structure du LPS. Ce mécanisme confère une résistance à la colistine même chez les biofilms matures (de plus de 4 jours). Les auteurs ont également démontré qu'un traitement utilisant différents composants qui ciblaient des sous populations physiologiquement différentes, pouvait tuer la majorité des cellules du biofilm.

Conclusion

Les diverses études menées sur les biofilms ont permis de mieux connaître les mécanismes de formation et de résistances aux antibiotiques de ces formes de vie bactériennes. Ces deux articles montrent une relation entre les phénotypes de résistance et l'expression de certains gènes spécifiques dans les biofilms, notamment le rôle des pompes à efflux de type MexAB-*oprM* ou encore l'expression de l'opéron *pmr* qui modifie la structure du LPS. Ces deux mécanismes ne sont que des exemples parmi de nombreux autres comme par exemple la séquestration des antibiotiques dans la matrice polysaccharidique ou la production d'enzyme de dégradation. Ces différentes études ont pour but une application clinique, les biofilms étant à l'origine de nombreux problèmes de santé publique. Dans les hôpitaux, ces biofilms donnent des infections extrêmement graves et très difficiles à soigner du fait de leur grande résistance à de multiples antibiotiques. La compréhension de ces nombreux mécanismes de résistance est donc essentielle à la lutte antibactérienne en milieu hospitalier. Même s'il y a des nombreuses pistes, il reste malheureusement encore beaucoup de choses à découvrir avant de pouvoir combattre efficacement les biofilms.

Bibliographie

- Li Zhang and Thien-Fah Mah. 2008. Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics. *Journal of Bacteriology* **190** : 4447-4452.
- Sünje Johanna Pamp, Morten Gjermansen, Helle Krogh Johansen, and Tim Tolker-Nielsen. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Molecular Microbiology* **68** : 223-240.
- Costerton.J.W, Stewart.P.S, and Greenberg.E.P.1999. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- C.A. Fux, J.W. Costerton, P.S. Stewart and P. Stoodley Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiology* **Vol.13** No.1 January 2005
- Eliana Drenkard 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* **5**: 1213–1219
- Haagensen.J, Klausen.M, K.Ernst.R, I.miller.S, Folkesson.A, Tolker-Nielsen.T, and Molin.S. 2007. Differentiation and distribution of colistin and sodium dodecyl sulfate- tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology* **189**: 28-37.
- Klinger.C, Filloux.A, and Lazdunski.A. 2005. Les biofilms, forteresses bactériennes. *La recherche* **389**: 42-46.
- Mah.T.F, and O'Toole.G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* **9**: 34-39.
- Mah.T.F, Betsey.P, Pellock.B, Walker.G.C, Stewart.P.S, and O'Toole.G.A. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310.