

# **Macrolides & apparentés: Mécanisme d'action & mécanismes de résistance**

**Pr ag. Boutiba-Ben Boubaker I**

Service de Microbiologie  
Hôpital Charles Nicolle – Tunis

*Monastir Avril 2009*

# INTRODUCTION

## Macrolides, Lincosamides, Streptogramins (MLS):

≠ familles antibiotiques de structures chimiques distinctes

### **Classification dans un même groupe:**

- 1- Spectres d'activité comparables:
- 2- Même mécanisme d'action: inhibition synthèse protéique
- 3- Résistances croisées: Sites de liaison communs aux ribosomes

## Oxazolidinones:

Nouveaux antibiotiques: inhibent synthèse protéique, mais **cible différente**

→ Pas de R croisée

→ Pas d'antagonisme

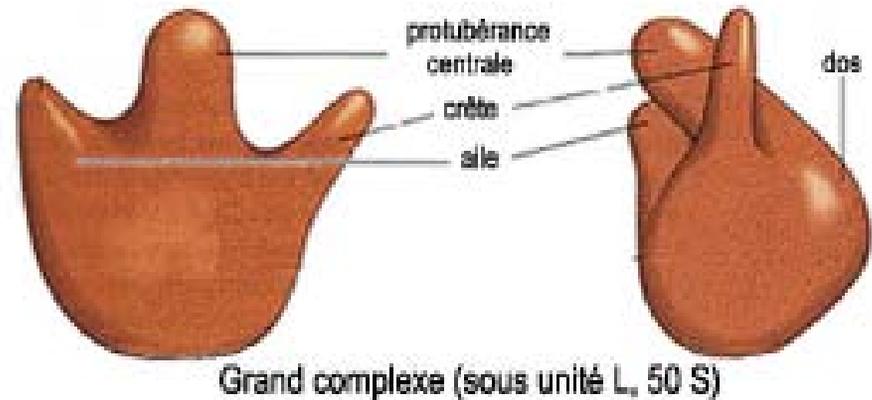
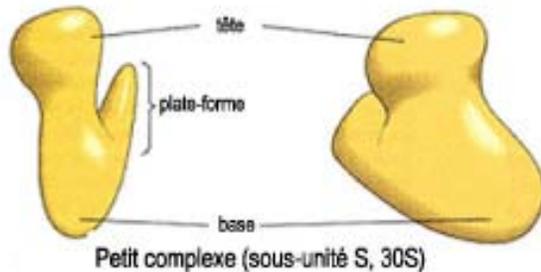
# RAPPEL

Structure du ribosome  
Etapes de la synthèse protéique

# RIBOSOME

Organite présent dans le cytoplasme (~15 à 18000/ bactérie)

- Siège de la synthèse protéique → Décode l'information génétique
- Ribosome bactérien (70S) est composé de 2 sous unités 30S et 50 S



## Sous-unités 30S :

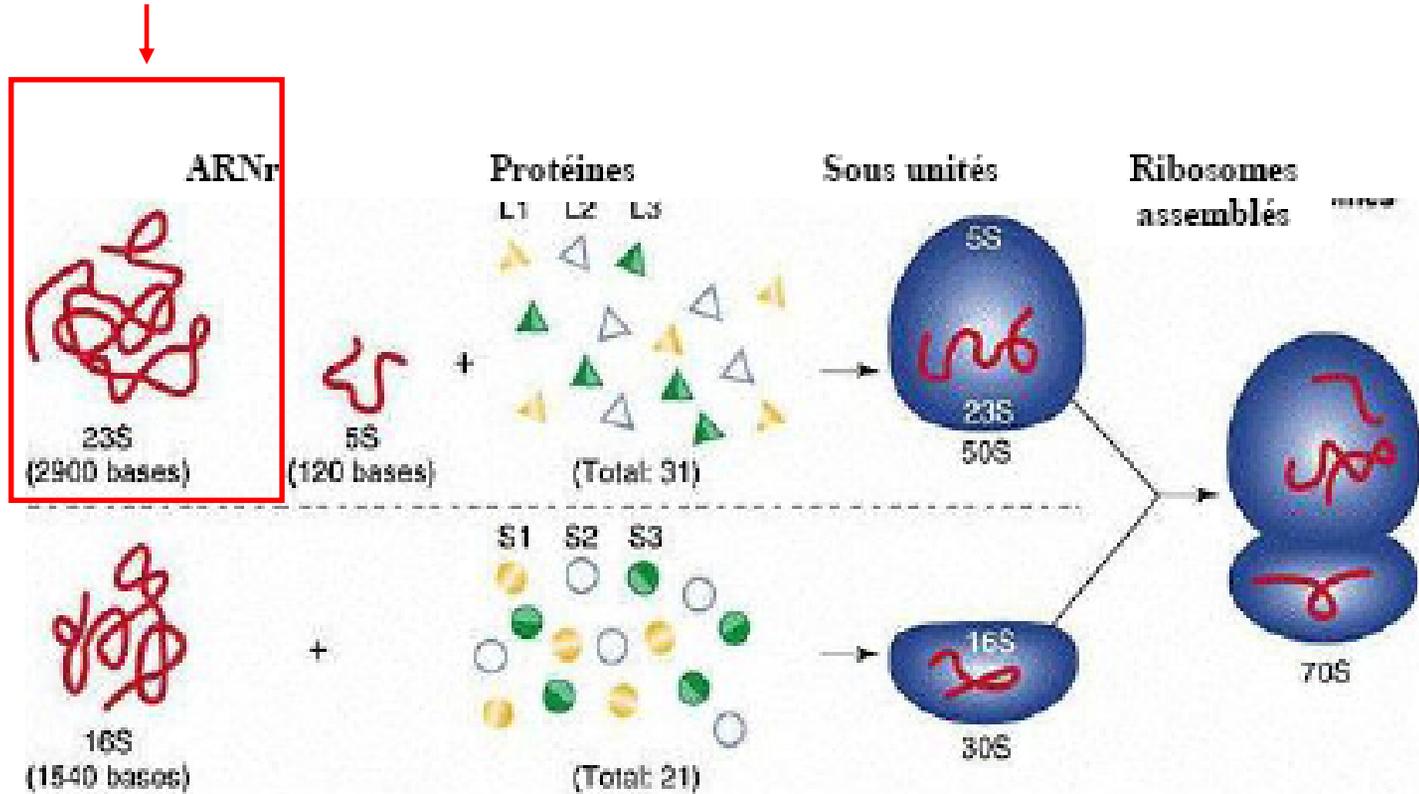
- Choix de l'ARNt
- Décodage de l'information portée par l'ARNm

## Sous-unité 50S :

- Formation de la liaison peptidique entre les AA portés par l'ARNt

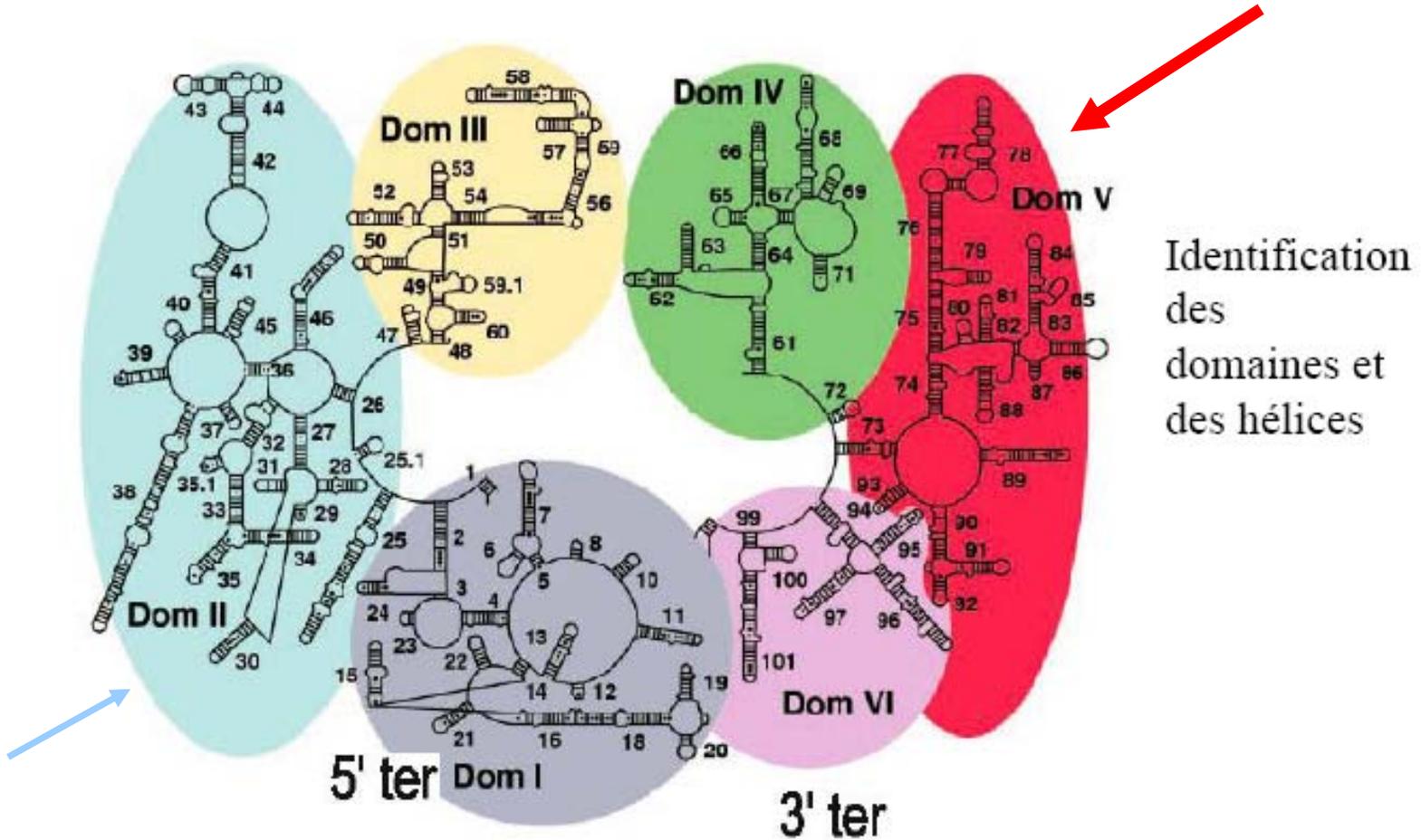
Ribosome: Composé de plus de 50 protéines et 3 molécules d'ARN ribosomique

Cible d'action des MLSK



Les gènes codant pour ARNr (*rrn*) sont organisés en opérons

Ces opérons  $\exists$  en 1 ou plusieurs exemplaires sur le chromosome



N.Ban et al., (2000) Science, 289, 905-920

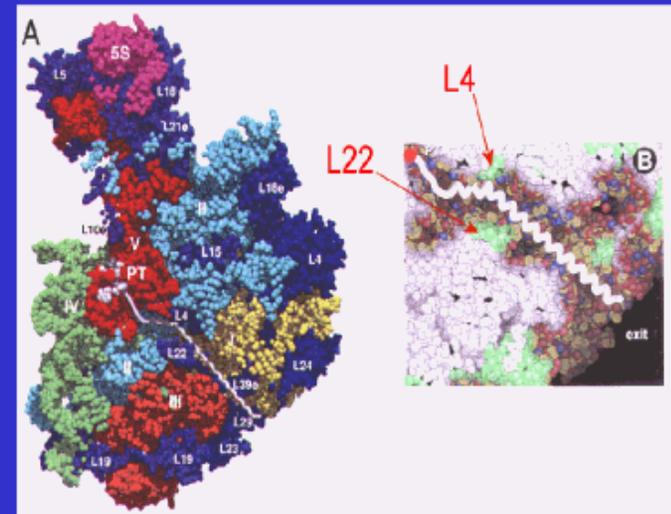
La structure secondaire de ARNr 23S se replie en épingles à cheveux (appariement leurs bases) → 6 domaines (I à VI)

# Structure tertiaire des ribosomes

Maintenue par 50 protéines ribosomales dont L4 et L22 +++

L22 interagit avec les 6 domaines de l'ARNr 23S et contribue avec L4 à la formation du **tunnel de progression peptidique**

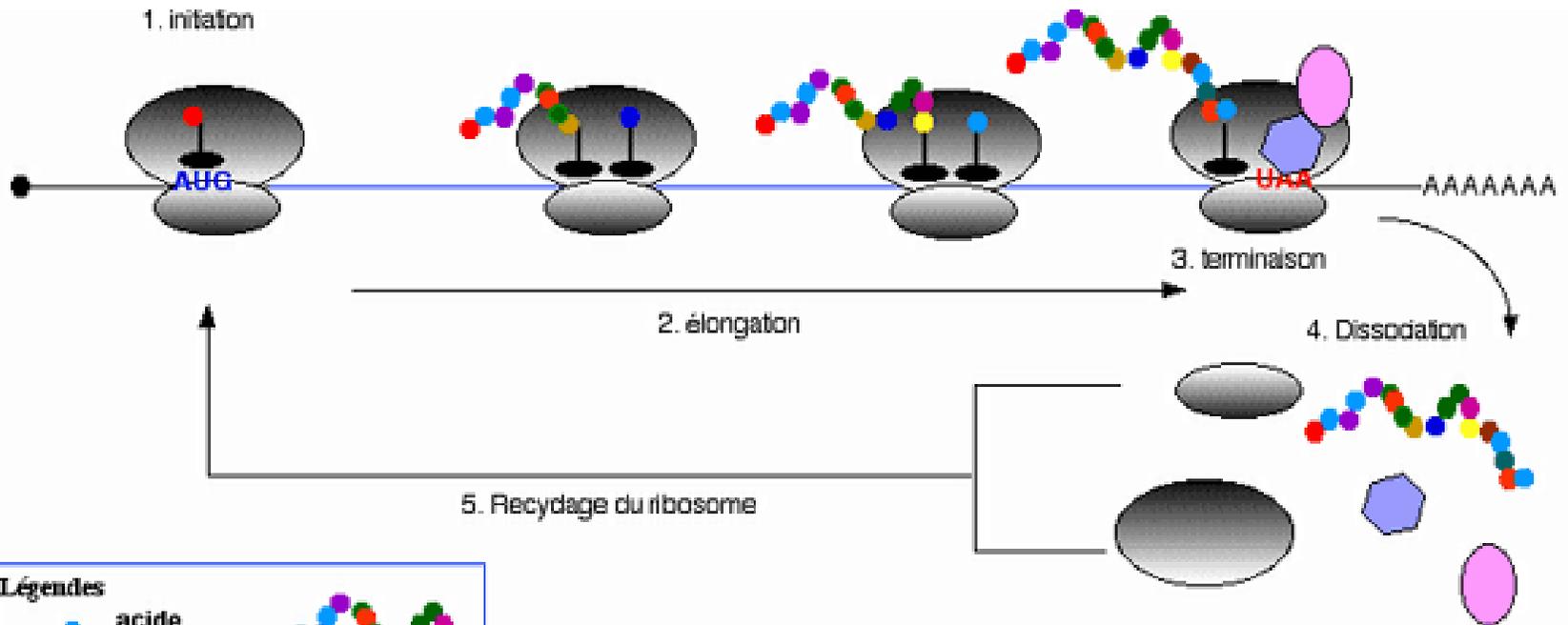
## 50S ribosomal subunit



Nissen, P et al. 2000. Science. 289:920-930

# RAPPEL:

## Différentes étapes de la synthèse protéique



### Légendes



acide aminé



ARnt



eRF1



Sous-unités du ribosome



Sous-unités du ribosome



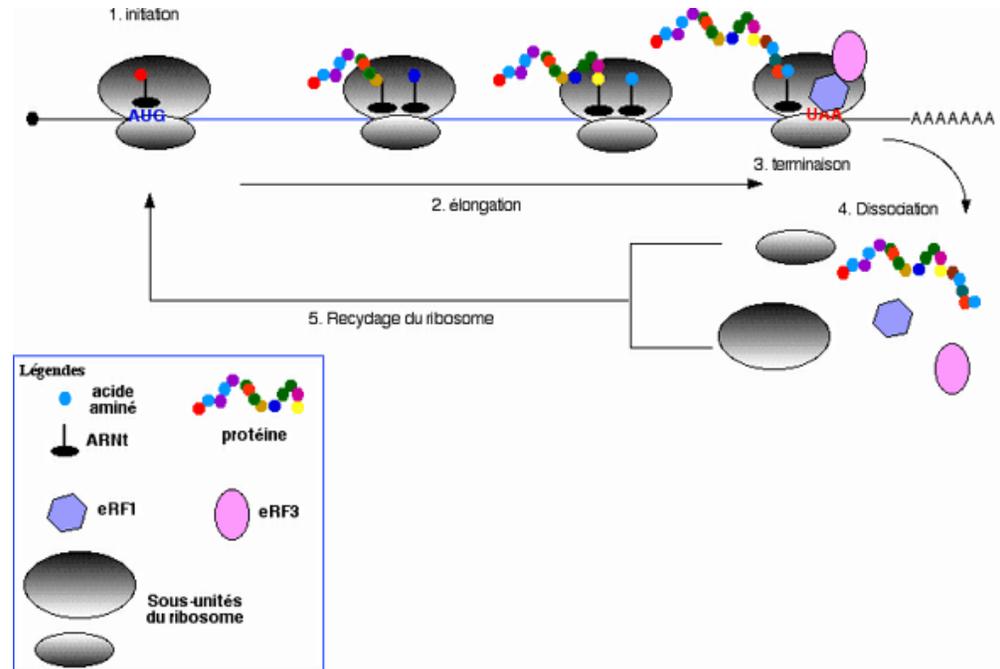
protéine



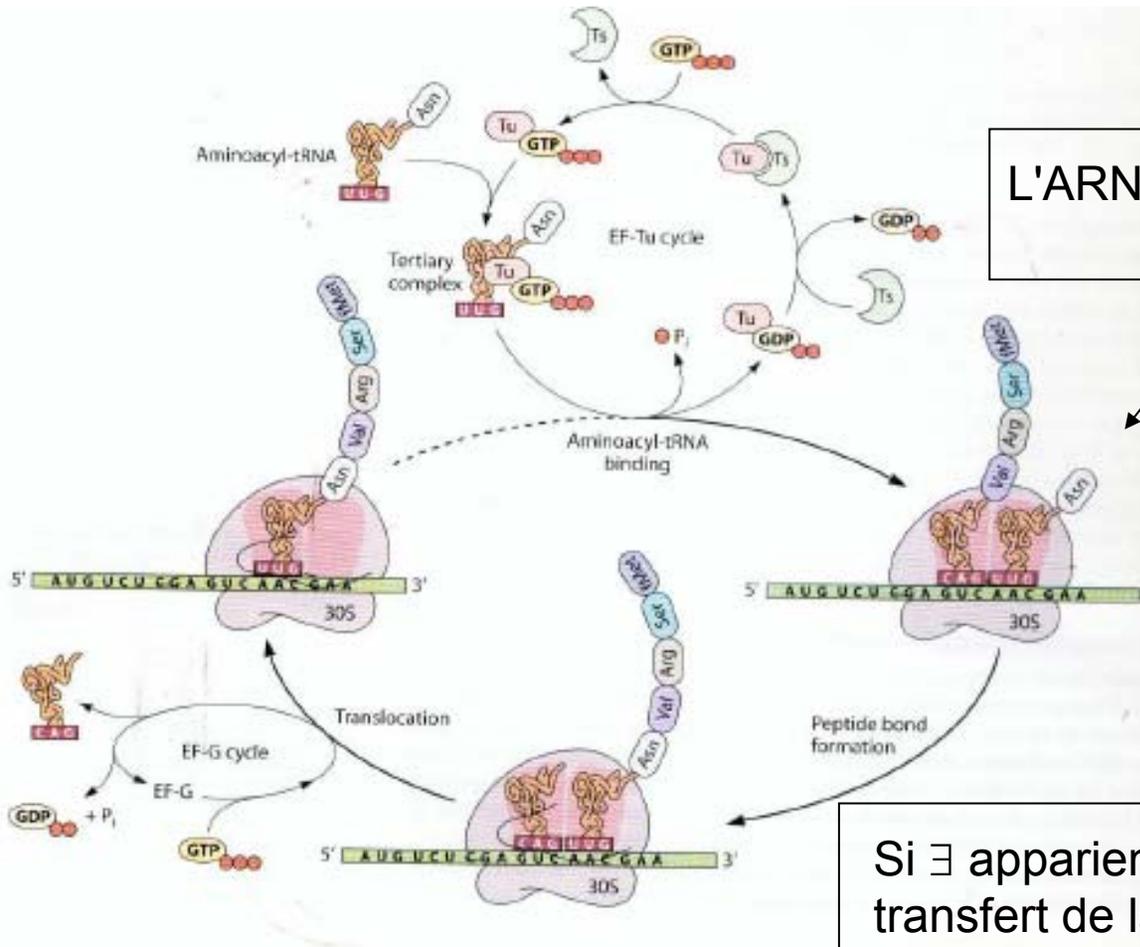
eRF3

# INITIATION

Commence au codon initiateur (AUG)  
Code la Formylmethionine (methionine dont la fonction NH2 est bloquée par un acide formique)



# ELONGATION



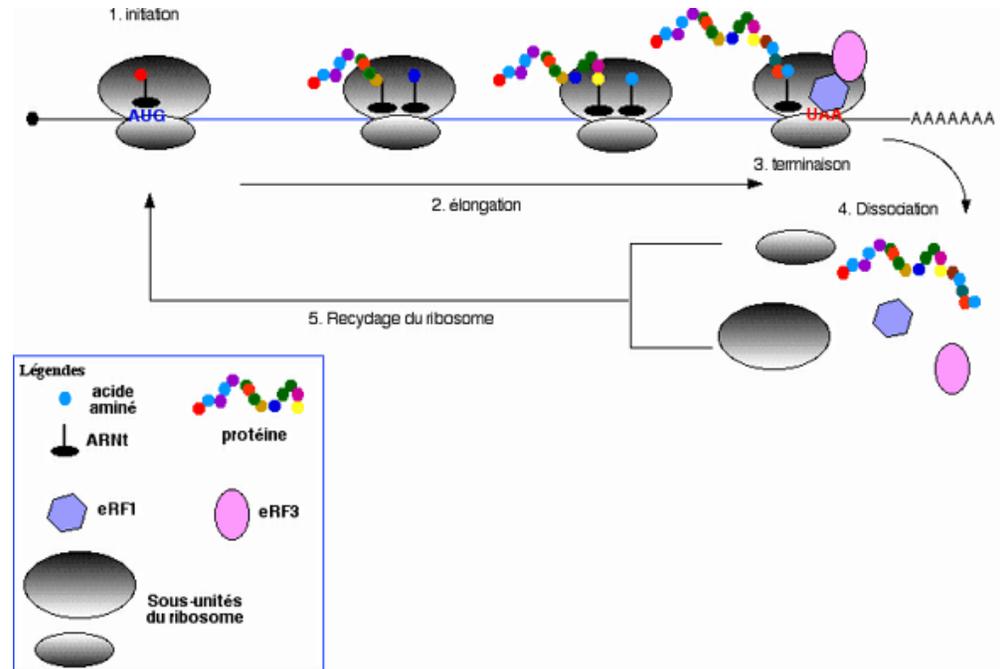
L'ARNt pénètre dans le ribosome au site A

Si  $\exists$  appariement codon/anticodon transfert de la protéine en élongation sur le nouvel AA apporté par l'ARNt: grâce à l'activité peptidyl-transferase du ribosome

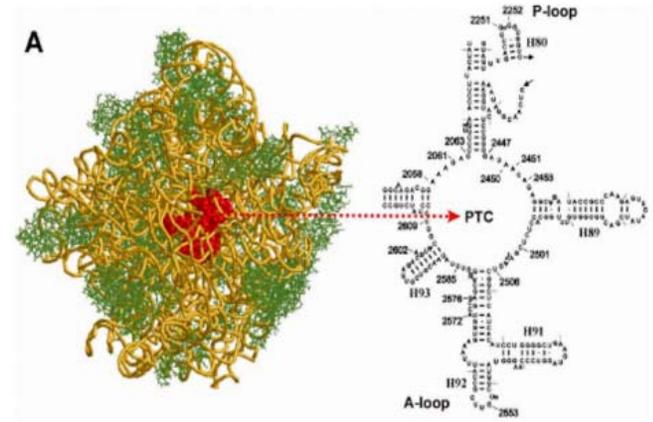
Puis, le ribosome se déplace d'un codon (translocation) et un nouveau cycle s'effectue

# TERMINAISON

Lorsque le codon stop (UAA, UAG ou UGA) pénètre dans le ribosome  
→ Les facteurs de terminaison (eRF)  
vont provoquer l'arrêt de la synthèse protéique, le relargage de la protéine nouvellement synthétisée, et la dissociation des deux sous-unités du ribosome



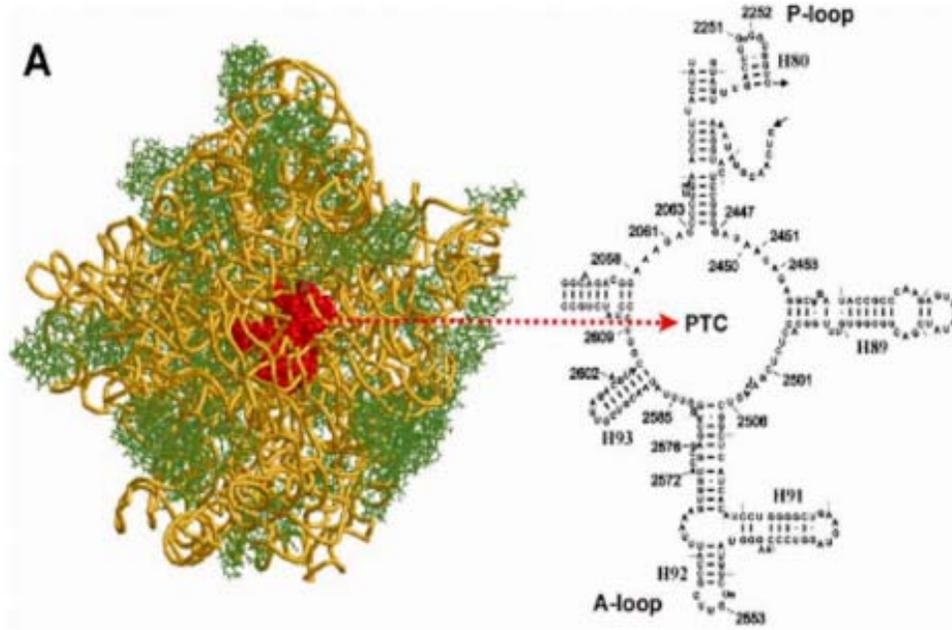
# MECANISME D'ACTION



## Différentes molécules MLS:

- Sites de fixation se chevauchent (ARNr23S)
- Mécanisme d'action similaire
- = Inhibition synthèse protéique

# Interaction MLS - ribosome



**Adénine en position 2058  
=  
Nucléotide clé**

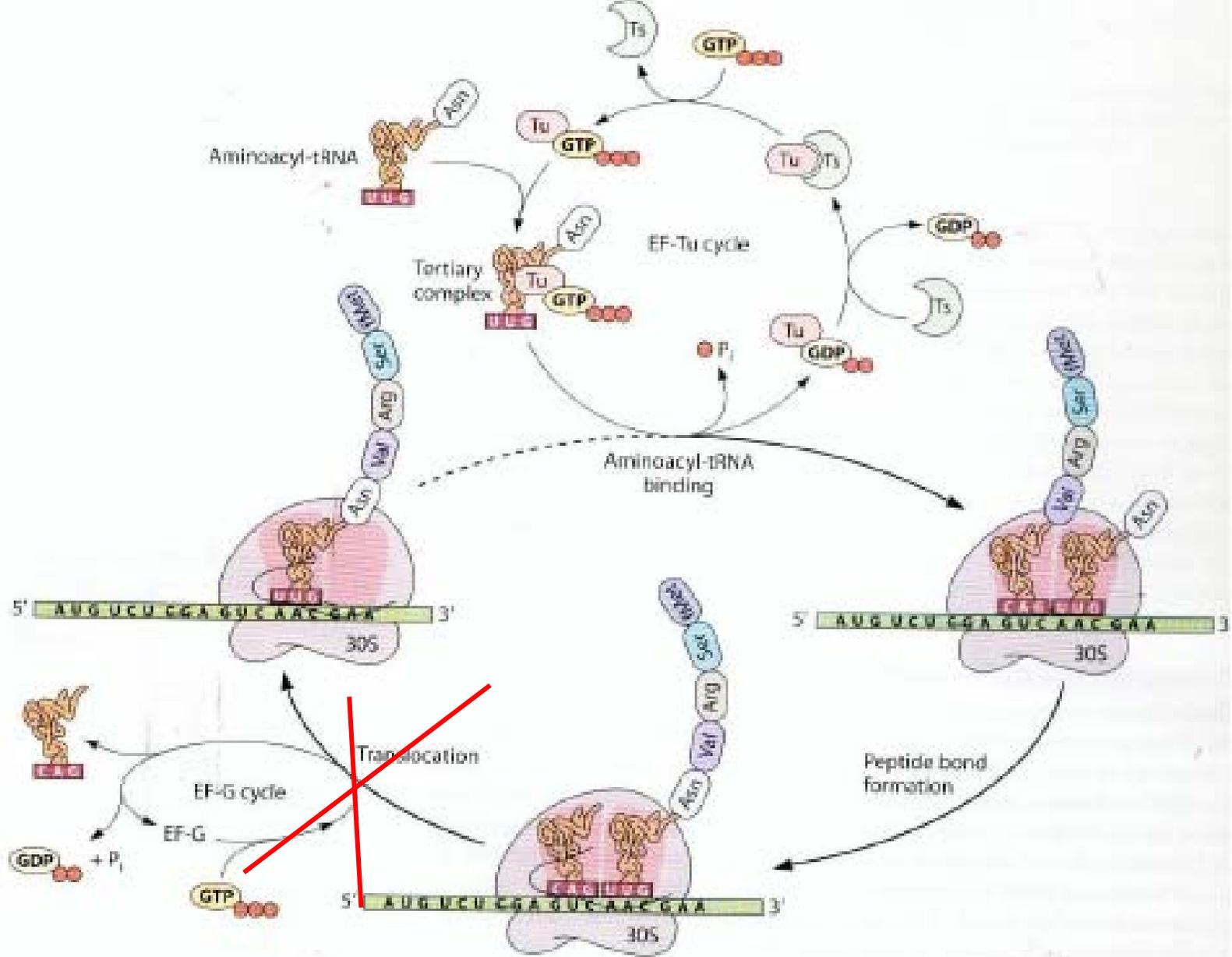
Site fixation localisé au niveau du tunnel de cheminement du peptide en formation:

→ Domaines V à proximité de la base de la cavité qui contient le centre peptidyl transférase

→ Protéines L4 et L22

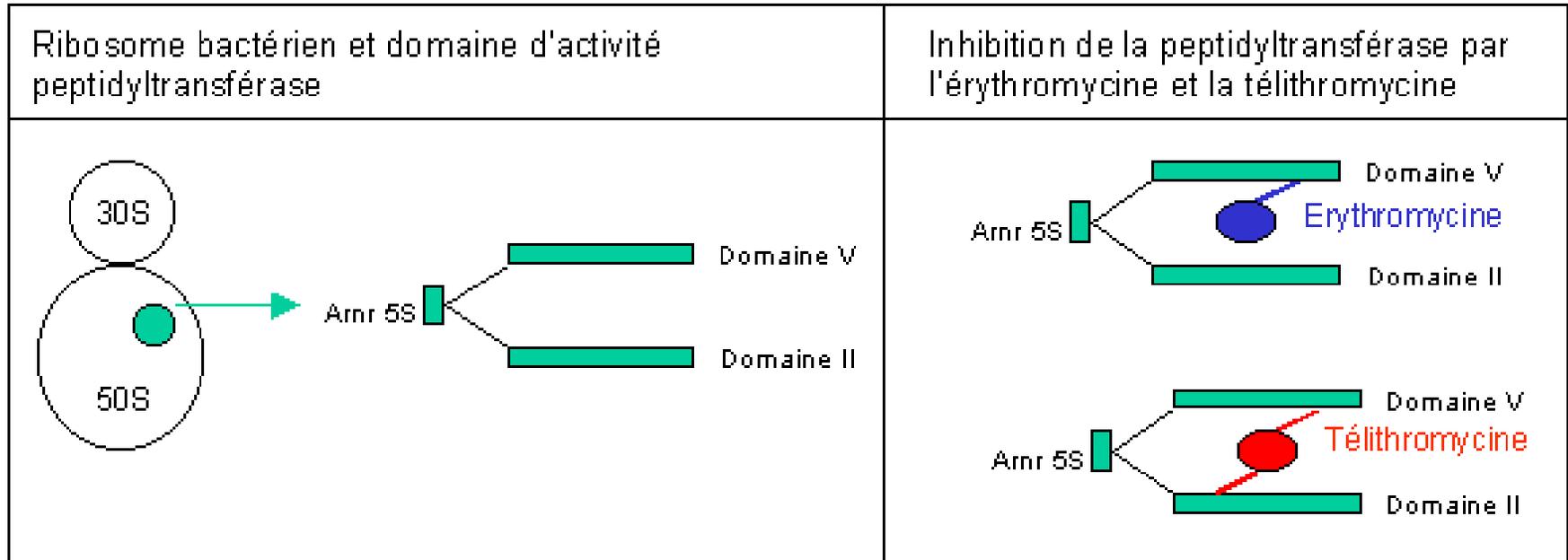
→ Domaine II (accessoirement)

↪ Blocage de la sortie du polypeptidique avec libération prématurée de peptidyl-ARNt et inhibition de la translocation du ribosome



↳ Inhibition de la synthèse protéique par inhibition de l'élongation

# MECANISME D'ACTION DES KETOLIDES

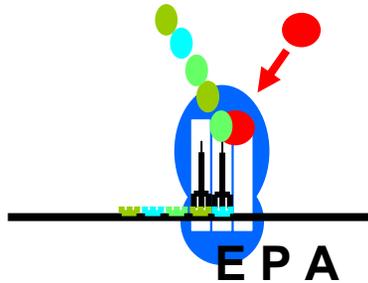


**Domaine V** (près du centre de la peptidyl-transférase lieu de synthèse de la chaîne polypeptidique): **Site de fixation principal E**

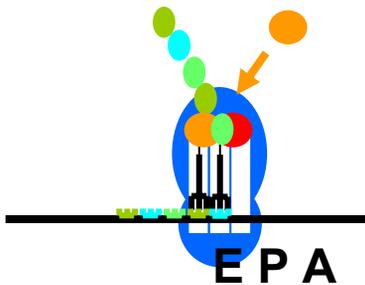
Par contre, affinité de fixation des **kétolides au domaine II est 10 fois >>** celle E

# STREPTOGRAMINES

Synergistine A + Synergistine B → Action synergique et bactéricide



- a- S'opposent à l'incorporation de l'ARNT au niveau des ribosomes
- b- Empêchent la traduction de l'ARNm



## Explication moléculaire de leur action synergique :

Fixation du composé A sur la sous-unité 50S: A2451, G2061, A2503  
(au niveau d'un site distinct de celui du composé B)

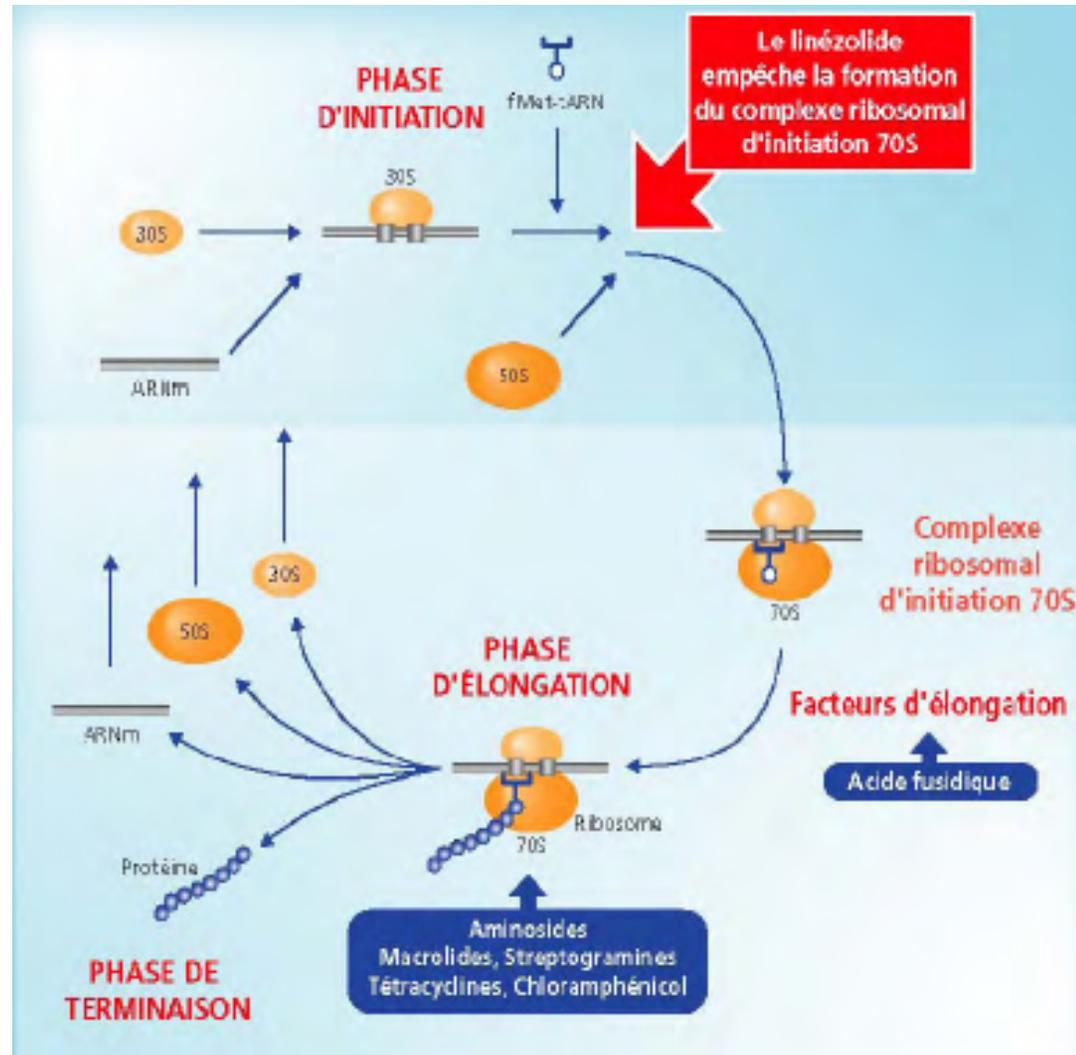
→ changement de conformation de certaines protéines

ribosomales, avec 2 conséquences :

1- Forte augmentation de l'affinité du composé B pour son site de fixation

2- Blocage irréversible de l'élongation de la chaîne peptidique, lié à un rétrécissement du canal de sortie du peptide en cours de synthèse

# MECANISME D'ACTION DES OXAZOLIDONONES



Cible différente des MLSK → pas

- d'antagonisme
- de résistances croisées

# Mécanismes de résistance

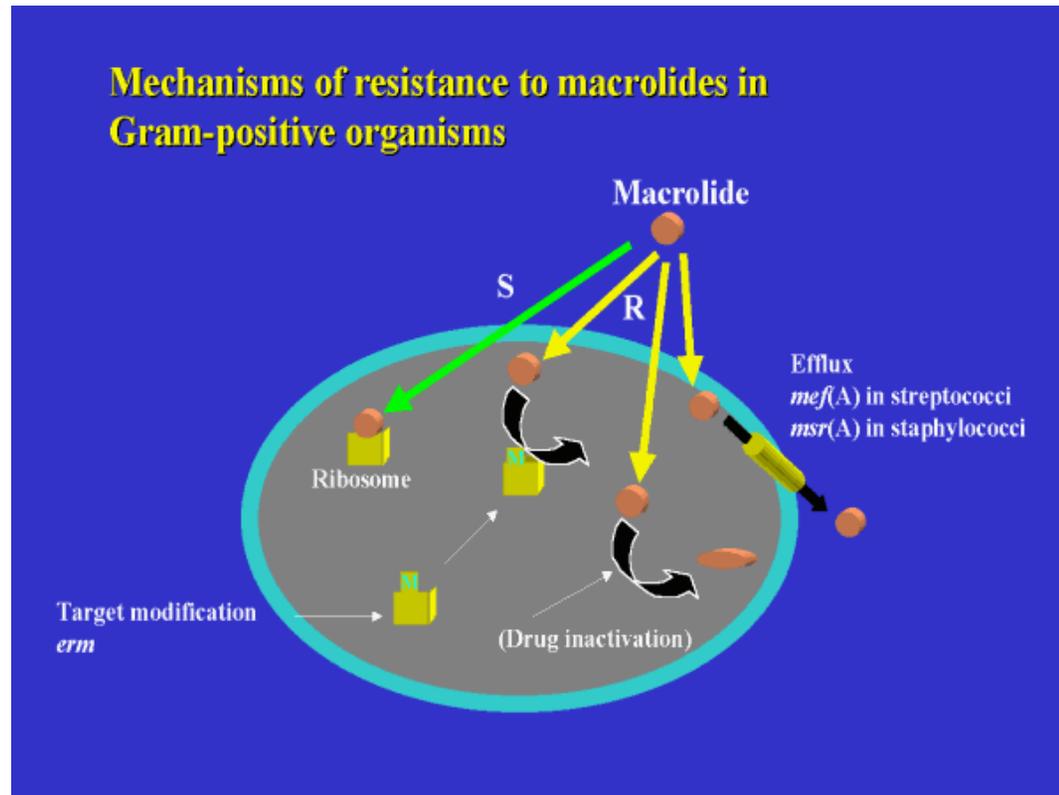
# Résistance naturelle

- **Certains entérocoques** : R lincosamides et streptogramines A
- ***Listeria monocytogenes***: R lincosamides
- ***Neisseria*** : R lincosamides
- **Les bacilles Gram négatif**, en particulier les entérobactéries, les *Pseudomonas sp.* et les *Acinetobacter sp.*: intrinsèquement résistants aux macrolides :
  - **Imperméabilité + efflux physiologique**

# Résistance acquise

∃ 3 mécanismes de résistance acquise:

- Modification de la cible
- Inactivation enzymatique
- Efflux actif



# **Modification de la cible +++**

**1. Méthylation ribosomale +++**

**2. Mutation des ARNr 23S**

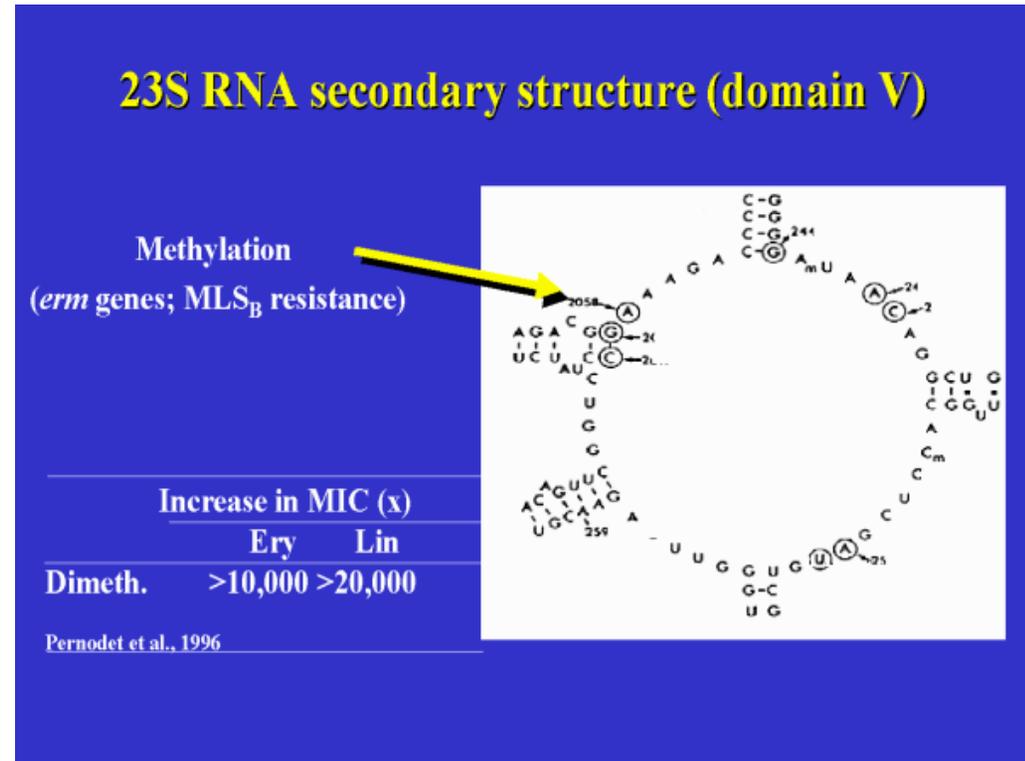
**3. Mutation protéines ribosomales L22 et L4**

# 1- Méthylation ribosomale

➤ Premier mécanisme de résistance ; resté le seul pendant plusieurs décennies

➤ La production de l'enzyme responsable de cette méthylation (méthylase) : sous le contrôle des gènes *erm* (erythromycin ribosome methylation)

➤ Méthylase → Diméthylation ARNr 23S au niveau d'un site unique du domaine V (A2058 : nucléotide clé dans la fixation M) → diminution affinité M à sa cible



Vu chevauchement des sites de fixation des macrolides, lincosamides et streptogramines B → R croisée d'où son nom de résistance MLSB

- Plus de 40 gènes *erm* ont été identifiés à ce jour
- Confusion règne quant à leur nomenclature (1 gène peut être désigné par 2 ou 3 noms différents)
- 4 classes majoritairement représentés chez les micro-organismes sont: *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* et *erm(F)*
- *ermA* et *ermC* : essentiellement chez les staphylocoques;
- *ermB* chez streptocoques & entérocoques;
- *ermF* chez *Bacteroides* sp. et autres bactéries anaérobies

# Support génétique

Essentiellement **plasmidique** ;

Rarement porté par des transposons

→ Evolution de cette résistance :

- Diffusion clonale ++
- ou mouvement de ces éléments génétiques mobiles

# Son expression phénotypique peut être de 2 types:

- **Phénotype constitutif**: expression permanente, rendant alors la bactérie d'emblée R aux MLSB et K  
(Altération activité bactéricide de SA+SB → Utilisation discutée)
- **Phénotype inductible**: elle requiert la présence de l'antibiotique inducteur pour s'exprimer

La structure globale de l'antibiotique détermine sa capacité d'induction :

Tous les MLSB sont des inducteurs à des niveaux variables:

- E induit la majorité des méthylases

- **Chez le pneumocoque (*erm(B)*)**: les inducteurs sont l'ensemble des macrolides (M14, M15 et M16), les lincosamides et les streptogramines B → MLSBi → R croisée aux MLSB

- **Chez les staphylocoques (*erm(A)* et *erm(C)*)**: les seuls inducteurs sont M à 14 ou à 15 atomes → MLSBi → M16 et L restent actifs mais ∃ risque de sélection de mutants constitutifs → Echec thérapeutique!!

**Kétolides**: non inducteurs restent actifs souches MLSBi (fixation domaine II de ARNr 23S)

NB: télithromycine moins active sur *S. pyogenes* (*ermB*) → activité de diméthylation de la méthylase de *S. pyogenes*

## 2- Résistance par mutation des ARNr 23S

*Mycobacterium avium* et *Helicobacter pylori* récemment *S. pneumoniae*

Résultat d'une mutation de gènes chromosomiques qui codent pour ARNr 23S (*rrn*) → réduction de l'affinité du macrolide pour sa cible

**Expression phénotypique variable selon :**

- **Nombre de copies mutées** (R ↑ lorsque nb copies mutées ↑)  
→ mécanisme plus fréquent chez les bactéries ayant un nb restreint de copies)
- **Nature de la base substituée**

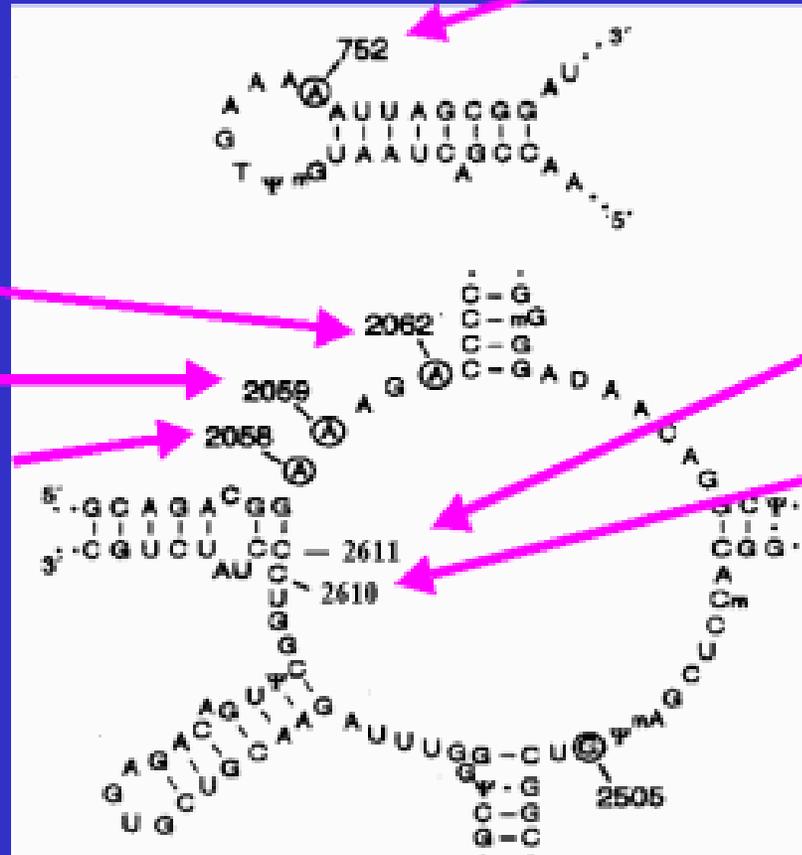
# In vitro and in vivo mutants of 23S rRNA in *S. pneumoniae*

M, K, L, S<sub>B</sub>

M16 et S<sub>B</sub>

M, L

M, K, L, S<sub>B</sub>



M<sub>M</sub>, K, L, S<sub>B</sub>

M, L

Wais-Kamradt et al., Antimicrob. Agents Chemother, 2000;

Lejeune and Courvalin, Antimicrob. Agents Chemother, 2001

Yaman et al., Antimicrob. Agents Chemother 2002;

<http://www.infectiologie.org.tn>

Uhlajamaki, M., et al. Antimicrob. Agents Chemother 2002

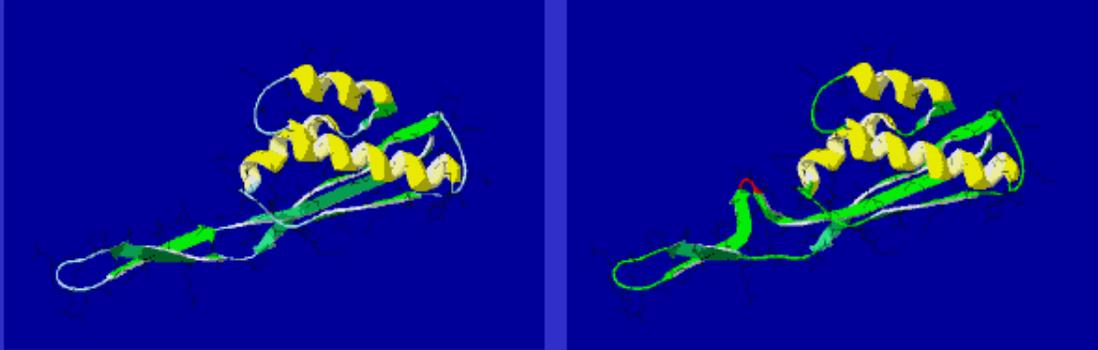
### 3- Résistance par mutation protéines ribosomiales L22 et L4

Résultat d'une mutation de gènes chromosomiques qui codent protéines ribosomiales (L22 et L4),  
→ changement de la configuration du tunnel peptidique  
→ changement structure tridimensionnelle ARNr23S  
→ réduction de l'affinité du macrolide pour sa cible

**Mutant L4** : rétrécissement du tunnel  
→ diminution de la capacité ATB à accéder à sa cible

**Mutant L22** : élargissement du tunnel  
→ ATB se fixe de façon inefficace

**Mutations of the *rplV* gene (L22)**



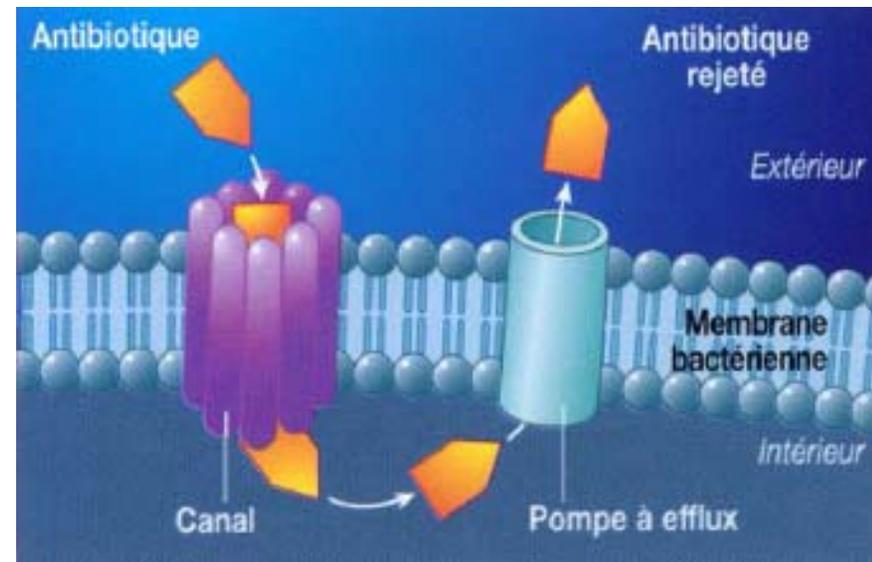
Wild-type L22                      Mutation in L22

M, k, SgB, SgA+B phenotype

*S. pneumoniae*  
Carr et al., Antimicrobial Agents Chemother 2002  
Farrell et al., ICAAC 2001  
Musher DM, et al. N Engl J Med. 2002

*S. aureus*  
Malbruny et al., Antimicrobial Agents Chemother 2002

# Résistance par efflux actif



Pompe à efflux	Phénotype de R	Espèces
<b>Classe MefA</b>	M14 et M15	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> Corynébactéries, entérocoques
<b>Classe Msr</b>	M14 - M15 et SB	Staphylocoques
<b>Classe Vga</b>	SA	Staphylocoques

# Résistance par inactivation de l'antibiotique

## ≠ Enzymes

- Modification antibiotiques
- Diminution leur affinité pour le ribosome

**Support génétique** : plasmides

Enzymes	Phénotype de R	Espèces concernées
Lincosamide nucléotidyl transférase	Résistance isolée à la lincomycine (Clindamycine S)	2-7% <i>Staphylococcus</i> et <i>E faecium</i>
Estérase	Macrolides	Entérobactéries et <i>S aureus</i>
Phosphotransférase		<i>S aureus</i>
Acétyltransférase	SA	<i>Staphylococcus</i> , <i>E faecium</i>
Hydrolases	SB	

# Mécanisme de R aux oxazolidinones

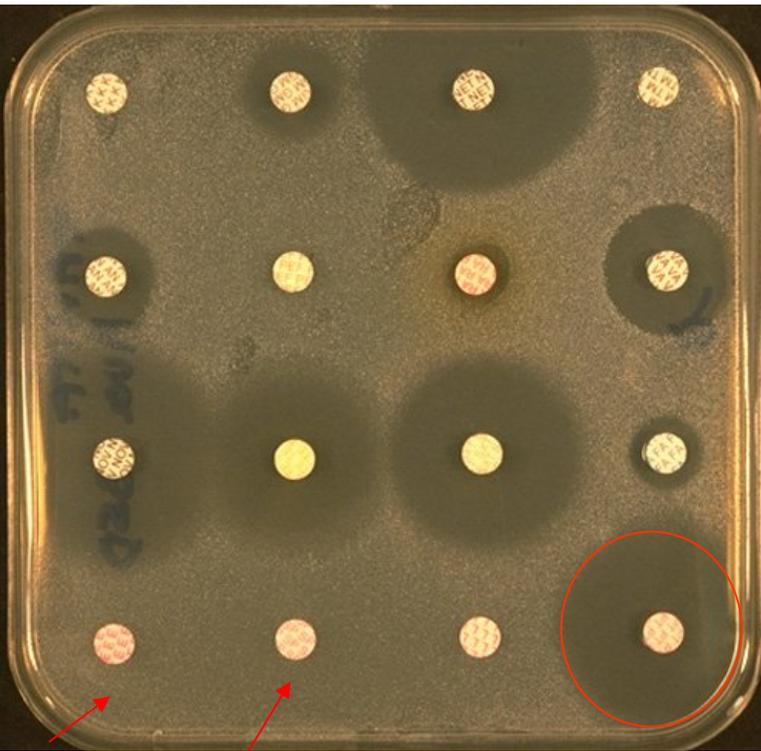
Résistance par : **Mutation de la cible** (ARNr 23S)

Cible unique → Pas de résistance croisée avec les autres d'antibiotiques (MLSK)

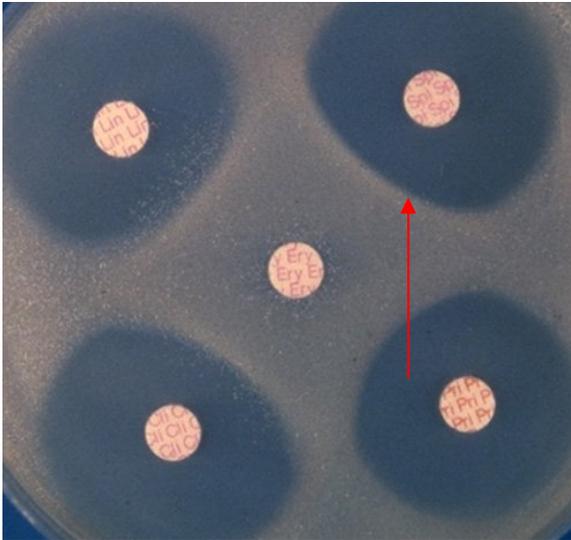
- Fréquence d'apparition de mutants in vitro  $10^{-9}$  à  $10^{-11}$
- Accumulation de mutations dans les différentes copies de *rrn* confère des niveaux de résistance croissants

# Moyens de détection de la résistance aux MLS

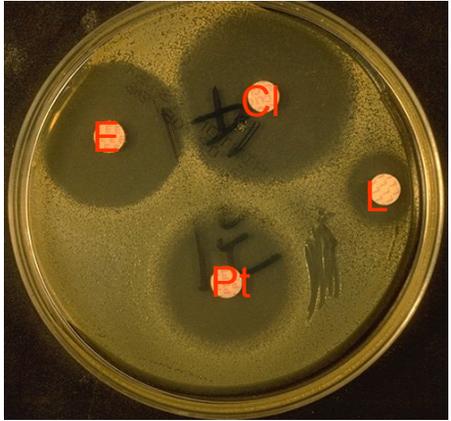
## Méthode phénotypique : Antibiogramme



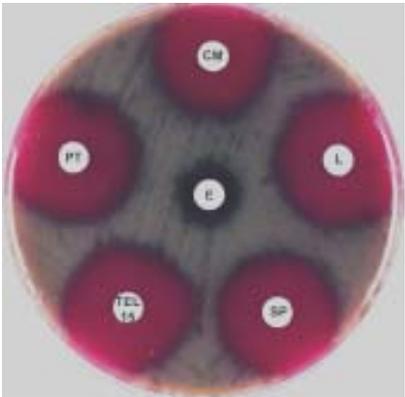
MLSb constitutive



MLSb inducible (antagonisme)

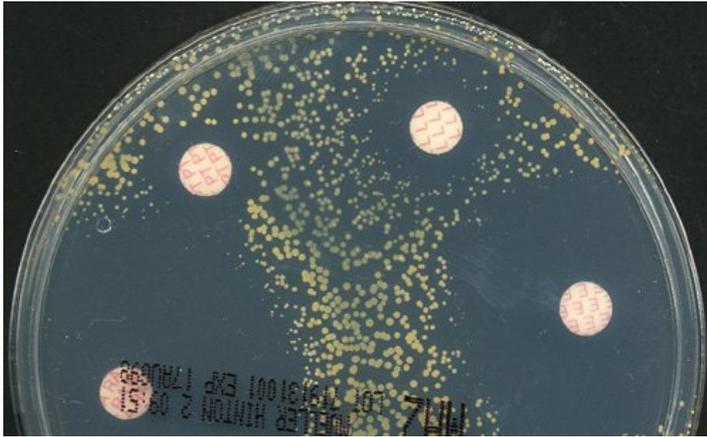


Disque lincomycine +++ (HNR)



Efflux actif

# Association plusieurs mécanismes



Il associe plusieurs mécanismes : SAA-SBH (streptogramine A acétylase + streptogramine B hydrolase) et LIN (lincosamides).

MLSb + streptogramine A acétylase + streptogramine B hydrolase

Confirmation : Méthodes moléculaires +++ : PCR & hybridation  
(mise en évidence des gènes spécifiques)

# Données européennes

Mécanismes de résistance aux macrolides et prévalence pour les principales bactéries impliquées

## A. Résistance par modification du ribosome par la méthylase (gènes *erm*)

- |  |   |
|--|---|
| - <i>S. pneumoniae</i><br>- <i>S. pyogenes</i> | - <i>erm</i> (B) présent dans 75-100% des souches Ery-R en Europe<br>- <i>erm</i> (B) et <i>erm</i> (A) généralement présents dans <50% des souches Ery-R |
|--|---|

## B. Résistance par modification du ribosome par mutation (ARNr, protéines)

- |  |  |
|--|--|
| - <i>S. pneumoniae</i><br>- <i>S. pyogenes</i><br>- <i>H. pylori</i> ,<br><i>Campylobacter</i> , <i>M. avium</i> | - occasionnellement chez les souches Ery-R<br>- rare chez les souches Ery-R<br>- les seules bactéries pour lesquelles ce mécanisme de résistance a une prévalence élevée |
|--|--|

## C. Résistance par efflux de l'antibiotique (gènes *mef*)

- |  |   |
|--|---|
| - <i>S. pneumoniae</i><br>- <i>S. pyogenes</i> | - présent dans <25% des souches Ery-R<br>- présent dans >50% des souches Ery-R (et jusqu'à 95%) |
|--|---|

NB: Mécanisme de résistance par efflux est prédominant aux USA et au Canada

# Pourcentages de résistance aux MLS: données tunisiennes

<b>Germe</b>	<b>Etude</b>	<b>E</b>	<b>CM</b>	<b>PT</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	<b>Etude multicentrique 1999-2007 (n=942 à 1097/an)</b>	<b>20-22.6%</b>	<b>3-5.3%</b>	<b>0.1-0.9%</b>
<hr/>				
<b>Pneumocoque</b>	<b>Etude multicentrique 1999-2007 (n=96 à 173/an)</b>	<b>40.3- 62.8%</b>	<b>-</b>	<b>0%</b>
<hr/>				
<b><i>S. pyogenes</i></b>	<b>Etude multicentrique 1999-2007 (n=127 à 234/an)</b>	<b>1.7-7.6%</b>	<b>1.9-6.1%</b>	<b>0%</b>
<b><i>S. agalactiae</i></b>	<b>HCN : 2005 (n=179)</b>	<b>40%</b>	<b>38%</b>	<b>0%</b>

## Mécanismes moléculaires de la résistance aux MLS: Données tunisiennes

	HCN				Etude multicentrique		
	<i>ermB</i>	<i>ermTR</i>	<i>mefA</i>	<i>ermB+mefA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA</i>	<i>ermB+mefA</i>
<b><i>S. pneumoniae</i></b> (1998-2004) (n=33)	91%	-	3%	6%	86%	12%	2%
<b><i>S. pyogenes</i></b> (2001-2004) (n=4)	100%	0%	0%	0%	-	-	-
<b><i>S. agalactiae</i></b> (2005) (n=28)	71.43%	3.57%	21.43%	3.57%	-	-	-

MERCI