

*“L’antibiorésistance dans son aspect évolutif”  
Séance thématique hepta-académique*



# Résistance à bas bruit: l’efflux

Katy Jeannot

CNR de la Résistance aux Antibiotiques *Pseudomonas* & *Acinetobacter*  
Centre Hospitalier Universitaire de Besançon

*Mercredi 12 juin 2024*

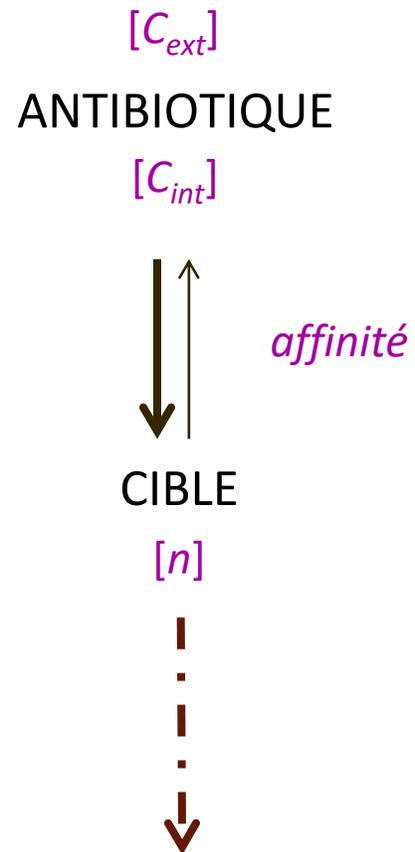


## Liens d'intérêt

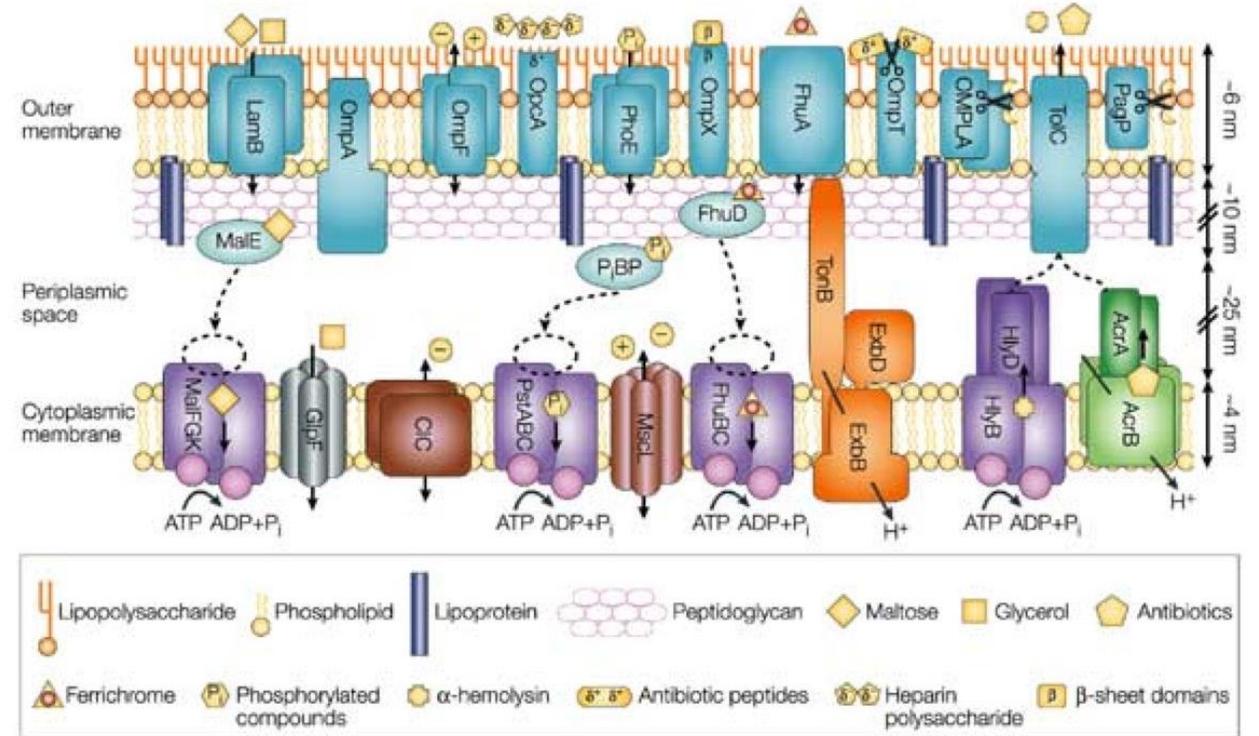
---

- Absence

# Le principe d'action d'un antibiotique



EFFET Bactériostatique/cide



JD. Faraldo-Gómez and Mark SP. Sansom. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2003

# Mécanismes de résistance aux antibiotiques

---

Inactivation  
Modification

**ANTIBIOTIQUE**

Efflux actif  
Imperméabilité

Protection

**CIBLE**

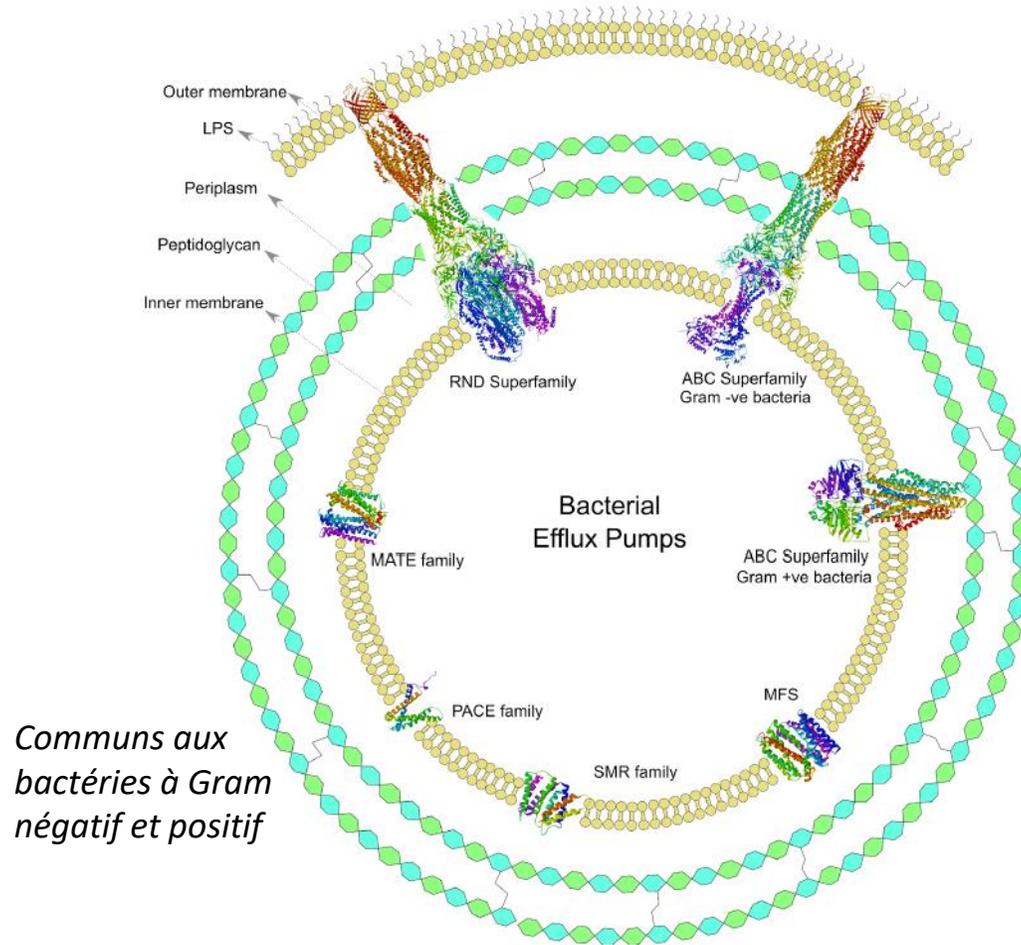
Substitution  
Amplification

Réduction de l'affinité

- Mutations
- Recombinaisons
- Modifications enzymatiques

# Superfamilles des systèmes d'efflux actif

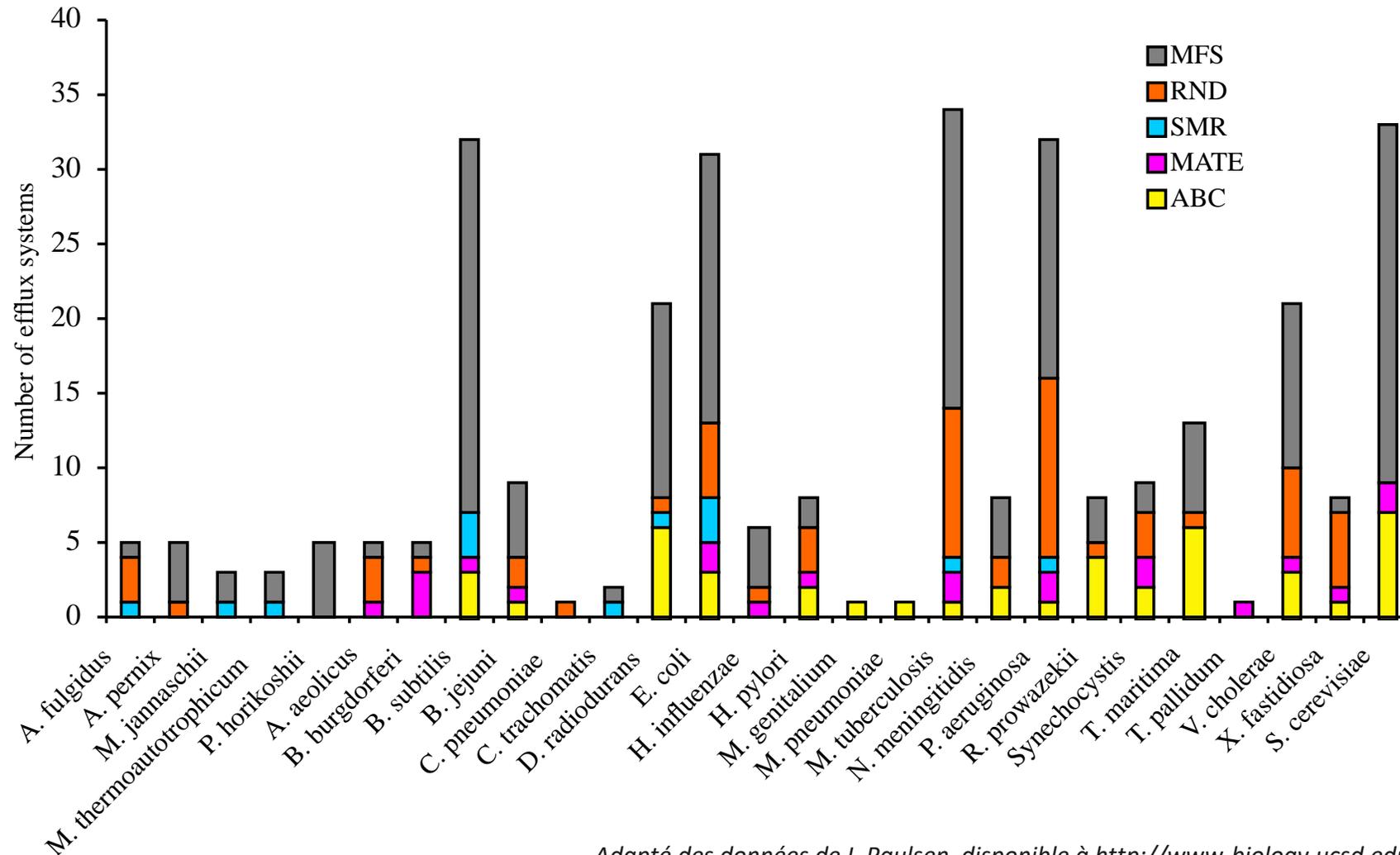
*Spécifique des bactéries à Gram négatif*



*Communs aux bactéries à Gram négatif et positif*

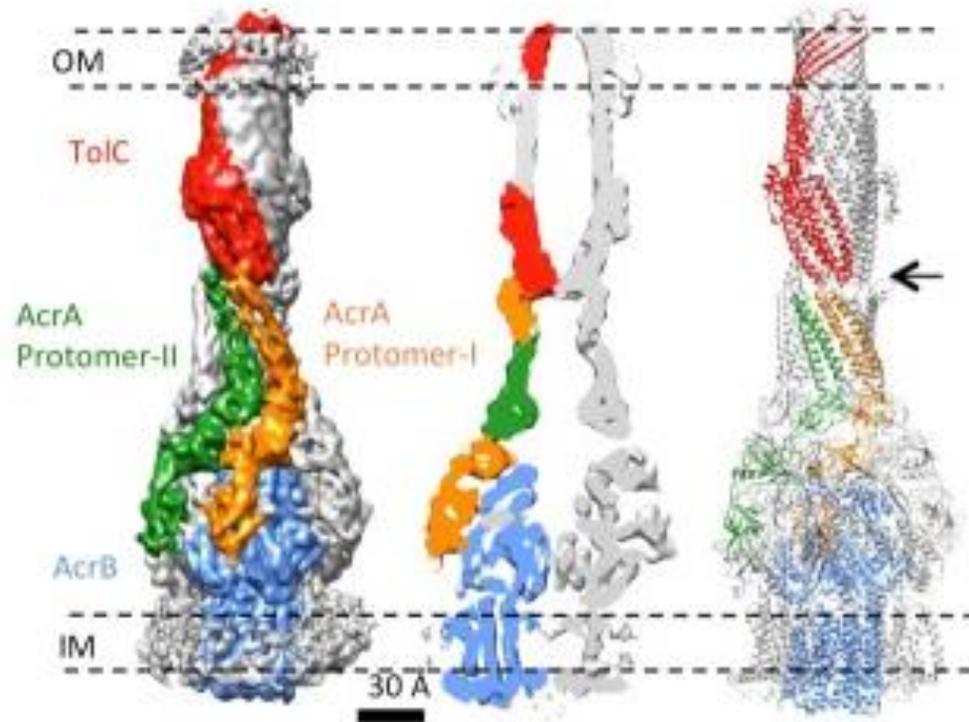
1. MATE , *Multidrug And Toxic Extrusion*
2. PACE, *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux*
3. SMR, *Small Multidrug Resistance*
4. MFS, *Major Facilitator Superfamily*
5. ABC, *ATP Binding Cassette*
6. RND, *Resistance Nodulation cell Division*

# Les systèmes d'efflux actif prédits à partir des génomes bactériens



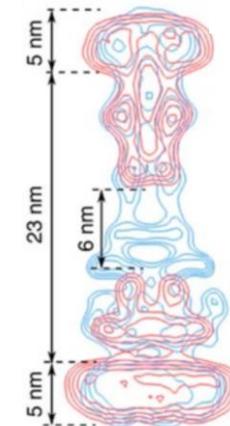
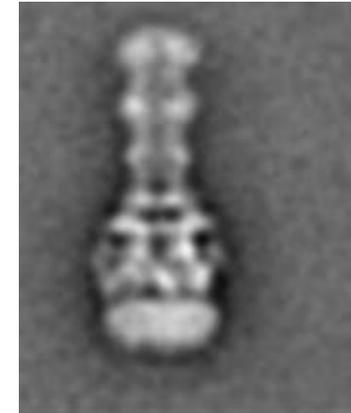
Adapté des données de I. Paulsen disponible à <http://www-biology.ucsd.edu>

# Les systèmes d'efflux actif de type RND



COMPLEXE TRIPARTITE  
AcrAB-TolC  
*E. coli*

Wang Z *et al.* *Elife*. 2017 Mar 29;6:e24905. doi: 10.7554/eLife.24905.



Nanomachine MexAB-OprM  
*P. aeruginosa*

Visualisation TEM, Microscopie électronique par transmission

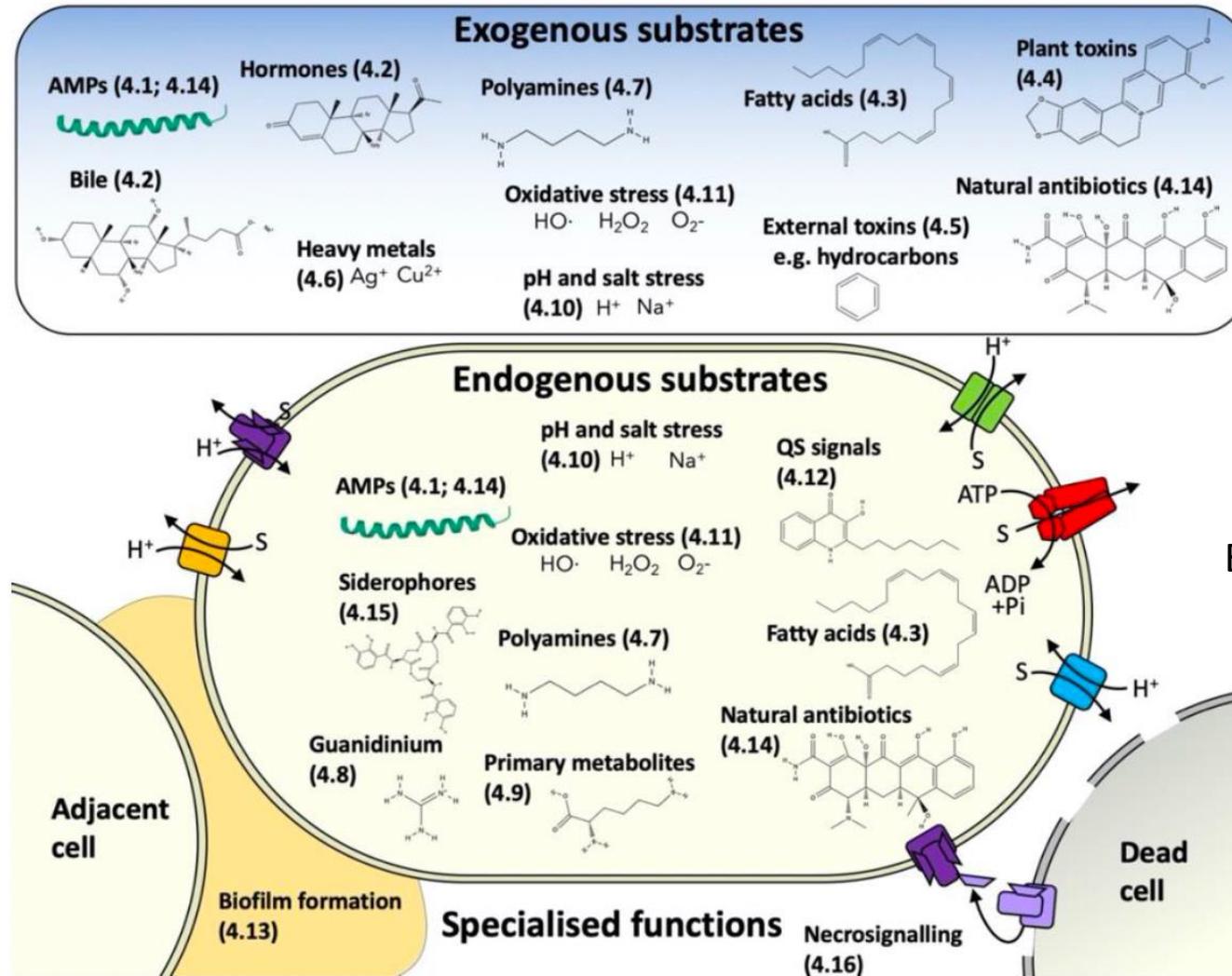
Daury L *et al.* *Nat Commun*. 2016 Feb 12;7:10731. doi: 10.1038/ncomms10731.

# Substrats des systèmes d'efflux RND

Rôle physiologique  
en lien avec la niche  
écologique



Maintien de  
l'homéostasie cellulaire



**Polyspécificité**  
des systèmes d'efflux

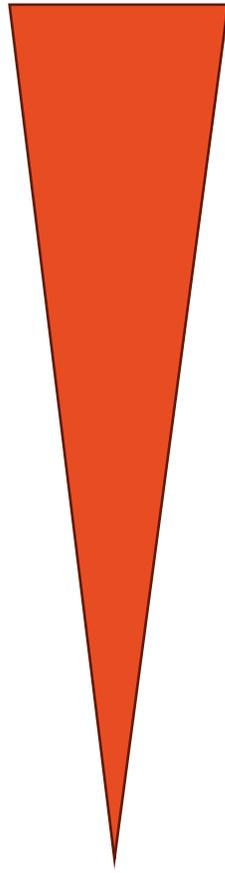


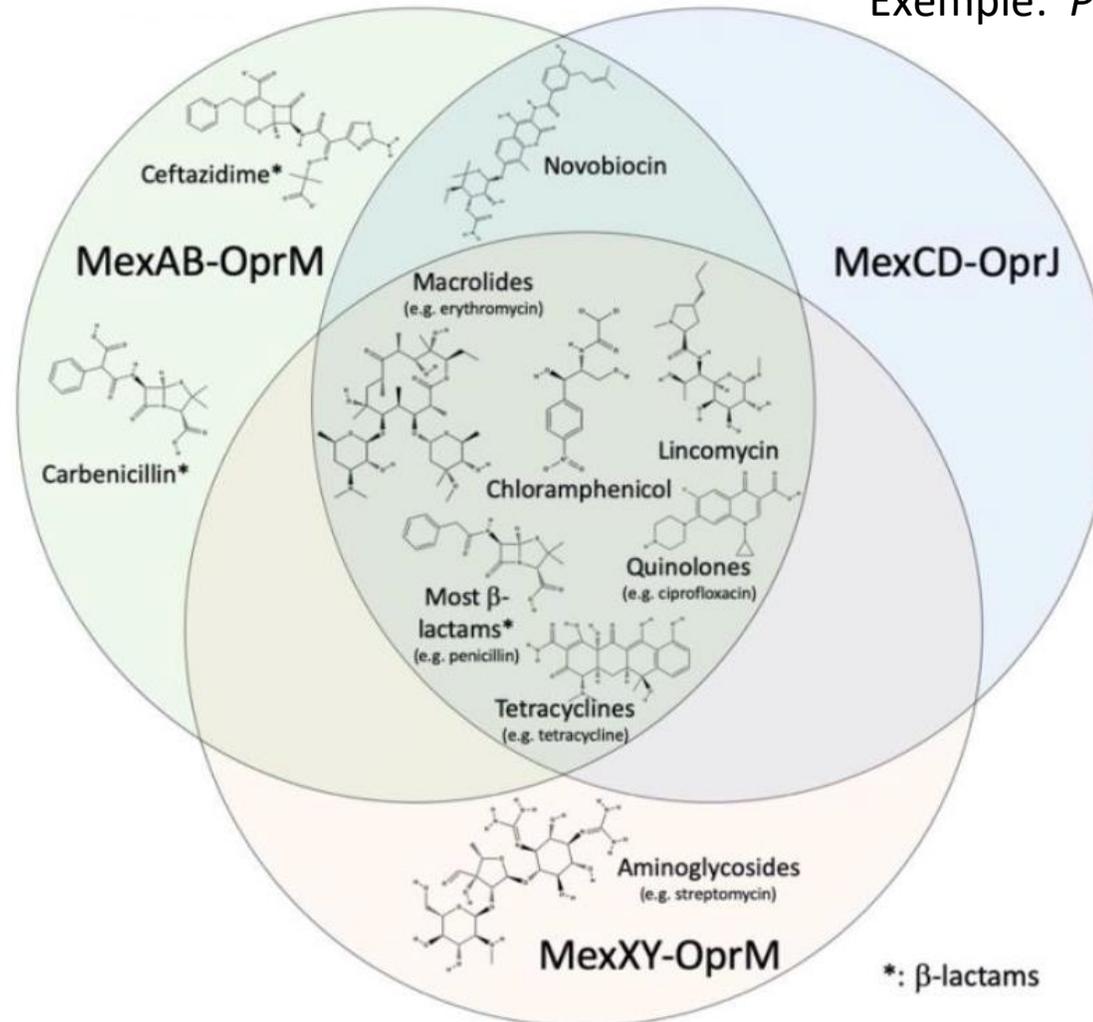
Export de molécules de taille  
et de structure différentes

“Multidrug efflux”

# Antibiotiques, substrats des systèmes d'efflux RND

Exemple: *P. aeruginosa*

- 
- Fluoroquinolones
  - Chloramphénicol
  - Macrolides
  - Tétracyclines
  
  - $\beta$ -lactamines
  - Pénicillines
  - Céphalosporines
  - Monobactam
  - Carbapénèmes
  
  - Aminosides
  - Acide fusidique
  - Rifampicine



# Substrats antibiotiques des systèmes d'efflux RND

(Exemple *P. aeruginosa*)

MexAB-OprM



**Système**

**Opéron**

**Substrats antibiotiques**

MexAB-OprM  
MexXY (OprM)

*mexAB-oprM*  
*mexXY(oprM)*

FQ,  $\beta$ -lactam, Tmp, Cmp, Tet, Nov, Ery, LMB415, AVI, REL  
FQ, AG, Fep, Cpo, Cbo, Tet, Ery, LMB415...

MexCD-OprJ

*mexCD-oprJ*

FQ, Cpo, Fep, Tmp, Cmp, Tet, Ery, LMB415...

MexEF-OprN

*mexEF-oprN*

FQ, Tmp, Cmp, Tet \*

MexHI-OpmD

*mexGHI-opmD*

FQ, Tet

MexJK (OprM)

*mexJK*

Tet, Ery

MexMN (OprM)

*mexMN*

Cmp

MexPQ-OpmE

*mexPQ*

FQ, Ery

MexVW (OprM)

*mexVW*

FQ, Cmp, Tet, Ery

CzcBA-OpmN

*opmN-czcBA*

\*

TriABC-OpmH

*triABC*

-

MuxABC-OpmB

*muxABC-opmB*

Nov, Atm, Tet, Ery

Tsutsumi K et al.  
Nat Commun 2019

FQ: (fluoro)quinolones;  $\beta$ -lactam (sauf imipénème); Tmp: triméthoprime; Cmp: chloramphénicol; Tet: tétracycline; Nov: novobiocine; Ery: érythromycine; AG: aminoglycosides; Fep: céfépime; Cpo: ceftiofime; Cbo: ceftobiprole; Atm: aztréonam. LMB415: peptidyl deformylase inhibiteur., AVI, avibactam; REL, relebactam; \* imipenem résistance associée à une répression de la porine OprD.

# The sink theory

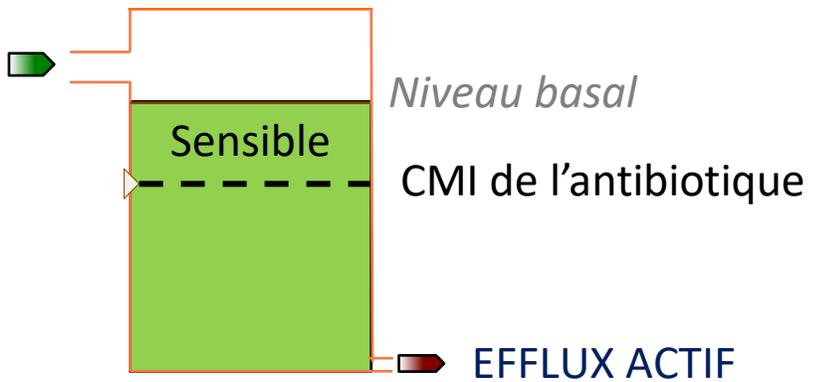
(avec une concentration fixe  $C_{ext}$ )

Souche sauvage

PERMÉABILITÉ  
MEMBRANAIRE

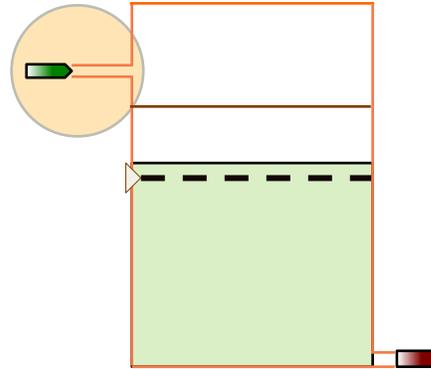
Entrée

Bactérie



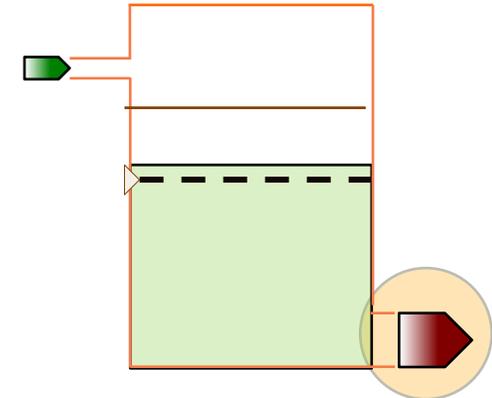
Pénétration > élimination

↓ PERMÉABILITÉ



Pénétration ↓

↑ EFFLUX ACTIF



Élimination ↑

*CMI: Concentration minimale inhibitrice*

# Rôle de l'efflux dans la résistance naturelle aux antibiotiques

---

Bactérie	Système	Substrats
<i>E. coli</i>	<b>AcrAB-TolC</b> <sup>1</sup>	Fq, $\beta$ -lactams <sup>3</sup> , Tc, Cmp, Nov, Ery, Fus, Rif...
	AcrEF-TolC <sup>2</sup>	Fq, $\beta$ -lactams <sup>3</sup> , Tc, Cmp, Nov, Ery, Fus, Rif...
	AcrD <sup>2</sup> -AcrA-TolC	AGs, Ery, PolyB
	CusABC <sup>2</sup>	-
	MdtABC-TolC <sup>2</sup>	Fq
	MdtEF-TolC <sup>2</sup>	Ery
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MexAB-OprM</b> <sup>1</sup>	Fq, $\beta$ -lactams <sup>1</sup> , Tc, Cmp, Nov, Ery, Fus, Tm...
<i>N. gonorrhoeae</i>	<b>MtrCDE</b> <sup>1</sup>	Tc, Cmp, $\beta$ -lactams <sup>1</sup> , Ery, Fus, Rif...

---

Fq: (fluoro)quinolones; Tc: tétracycline; Cmp: chloramphénicol; Nov: novobiocine; Ery: érythromycine; Fus: fusidic acid; Rif: rifampicine; AGs: aminoglycosides; PolyB: polymyxine B; Tmp: triméthoprim; 3<sup>rd</sup>GC: céfépime, céfpirome. <sup>1</sup> exprimé constitutivement chez les souches sauvages, <sup>2</sup> expression inductible, <sup>3</sup> sauf imipénème.

# Rôle de l'efflux dans la résistance naturelle aux antibiotiques

Exemple: *E. coli* AcrAB-TolC

Antibiotiques	Sauvage	AcrAB <sup>-</sup>
Acide nalidixique	4 - 8	<b>0.5</b>
Norfloxacine	0.03 - 0.12	nd
Ofloxacine	0.06	nd
Ciprofloxacine	0.03	nd
Ampicilline	2 - 4	0.5 - 2
Erythromycine	<b><u>128 - 256</u></b>	<b>&lt; 2 - 8</b>
Tétracycline	1 - 4	0.25
Chloramphénicol	4 - 8	0.5

Contribution à la résistance naturelle : CMI x 2-64

(MIC mg/l)

# Rôle de l'efflux dans la résistance **acquise**

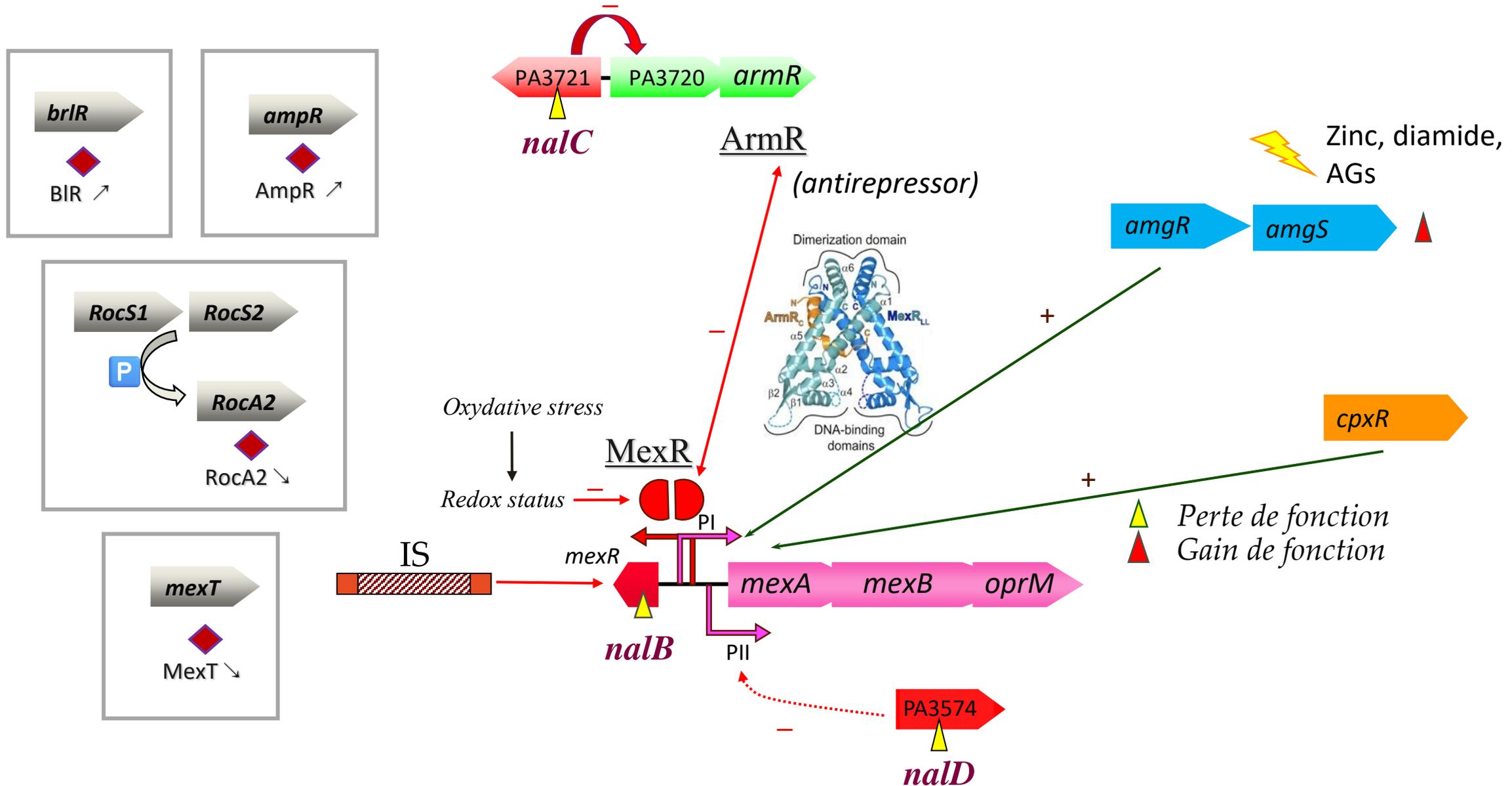
(Exemple : *P. aeruginosa*)

Antibiotiques	Sauvage	MexAB/OprM <sup>++</sup>	Variation
Ticarcilline (0.001/16)	16	128	8
Pipéracilline/tazobactam (0.001/16)	4	16	4
<b>Aztréonam</b> (0.001/16)	4	32	8
Ceftazidime (0.001/8)	2	4	2
Ceftazidime/ <b>avibactam</b> (8-8)	2	4	2
Céfépime (0.001/8)	4	8	2
<b>Méropénème</b> (2/8)	0.5	4	8
Imipénème (0.001/4)	1	1	-
Imipénème/relebactam (0.001/2)	0.25	0.5	-
Ciprofloxacine (0.001/0.5)	0.25	0.5	2
<b>Lévofloxacine</b> (0.001/2)	0.5	2	4

(CMI mg/l)

EUCAST 2024

# Evénements génétiques conduisant à la surproduction de MexAB-OprM efflux



# Impact de l'efflux sur la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques

(avec une concentration fixe  $C_{ext}$ )

Souche sauvage

PERMÉABILITÉ  
MEMBRANAIRE

Entrée

Bactérie

Sensible

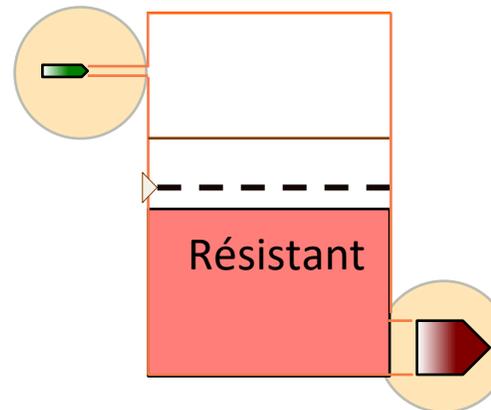
Niveau basal

CMI de l'antibiotique

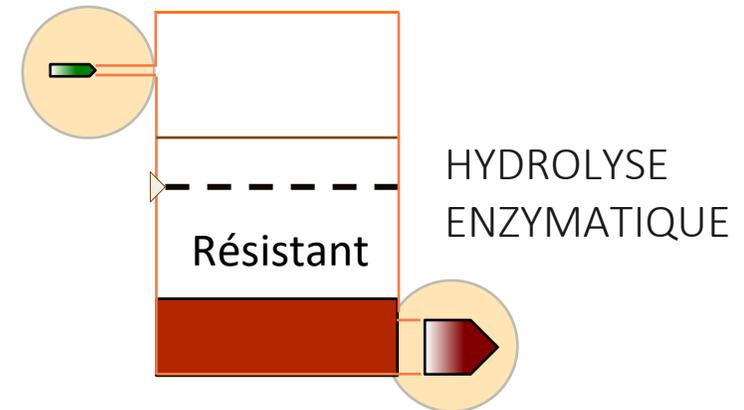
EFFLUX ACTIF

Pénétration > élimination

↓ PERMÉABILITÉ



↑ EFFLUX ACTIF



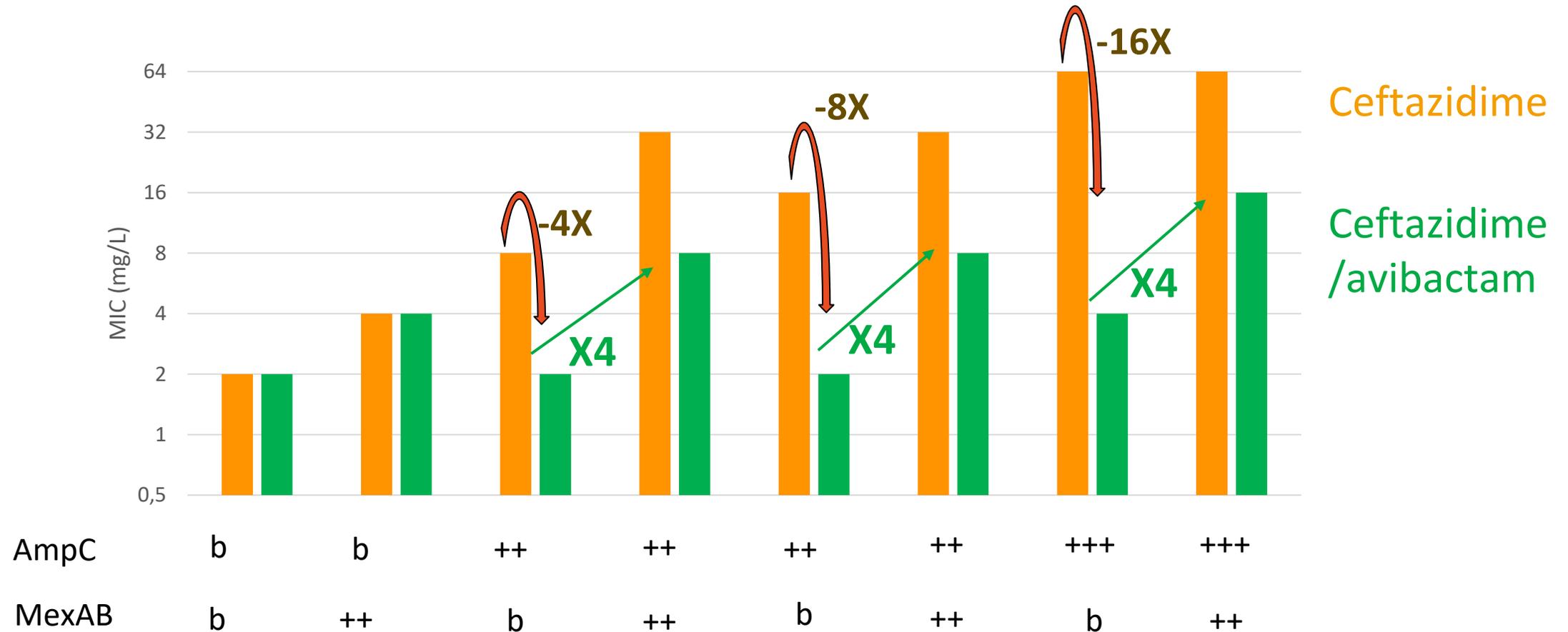
# Effet de l'association de mécanismes de résistance aux carbapénèmes

(Exemple : *P. aeruginosa*)

Mécanismes		IMP (0.001/4 mg/L)	MEM (2/8 mg/L)	DOR (0.001/2 mg/L)
PAO1 AmpC <sup>i</sup>	ENZYME	0.5	0.5	0.5
PAO1 AmpC <sup>i</sup> /OprD <sup>-</sup>	ENZYME + PERMEABILITE	<b>4</b>	2	1
PAO1 AmpC <sup>-</sup> /OprD <sup>-</sup>	PERMEABILITE	0.5	1	0.25
PAO1 AmpC <sup>i</sup> /ABM <sup>++</sup>	ENZYME + EFFLUX	0.5	2	1
PAO1 AmpC <sup>-</sup> /ABM <sup>++</sup>	EFFLUX	0.25	2	1
PAO1 AmpC <sup>-</sup> /ABM <sup>++</sup> /OprD <sup>-</sup>	EFFLUX + PERMEABILITE	0.5	<b>8</b>	<b>2</b>
PAO1 AmpC <sup>i</sup> /ABM <sup>++</sup> /OprD <sup>-</sup>	ENZYME + EFFLUX + PERMEABILITE	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>4</b>

Effet cumulatif conduisant à la résistance aux carbapénèmes

# Inhibiteur de $\beta$ -lactamase, avibactam



Niveau basal (b)

# Combinaison modification de la cible et efflux actif chez *P. aeruginosa*

CMI de la lévofloxacine (mg/L)

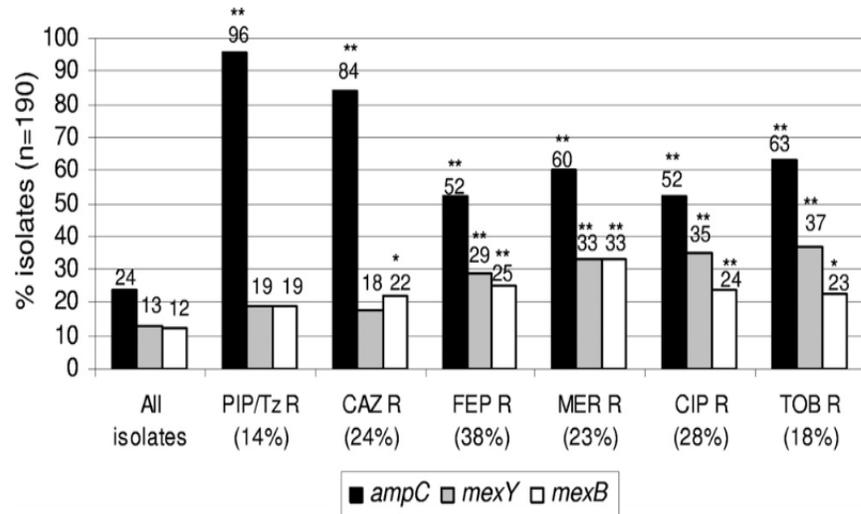
Target mutations	Sauvage	MexAB <sup>++</sup>	MexAB <sup>++</sup> + inh. 10 mg/l
Aucune	0.25	2	0.03
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile)	2	8	0.5
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	4	32	2
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile + Asp87->Tyr) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	16	128	8

EUCAST 2024

# Prévalence de l'efflux actif chez les souches cliniques *P. aeruginosa*

Souches cliniques  
isolées d'hémoculture (n=190 souches)

Etude multicentrique espagnole



Céfépime<sup>R</sup> 29% efflux  
Méropénème<sup>R</sup> 33% efflux  
Tobramycine<sup>R</sup> 37% efflux

Cabot G et al. 2011. Antimicrob Agents Chemother 55: <https://doi.org/10.1128/aac.01645-10>

Souches cliniques résistantes à  
l'imipénème (n=109 souches)

Etude multicentrique française  
Réanimation

86.3 % Défaut de perméabilité  
6.7% Carbapénèmases  
12.2% Efflux actif

Fournier D et al. J Antimicrob Chemother. 2013 Aug;68(8):1772-80. doi: 10.1093/jac/dkt098

Souches isolées des animaux  
essentiellement chez le chien  
(Réseau Resapath)

5.7% de résistance aux  
carbapénèmes (n=30 souches)

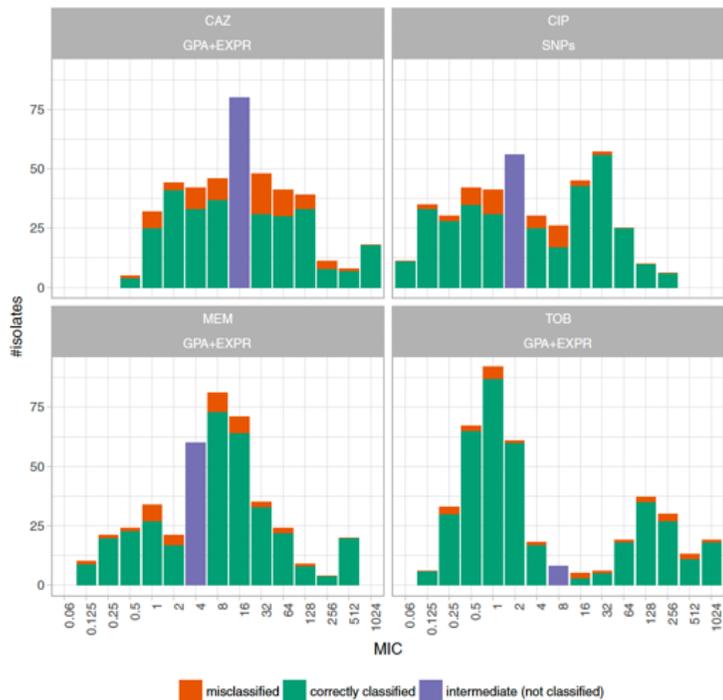
66% Défaut de perméabilité  
90% Efflux actif

Haenni M et al. Front Microbiol. 2017 Sep 29;8:1847. doi: 10.3389/fmicb.2017.01847

# Prédiction de la Sensibilité/Résistance aux antibiotiques

Antibiotic	Markers used	Sensitivity (resistance)	Sensitivity (susceptibility)	Predictive value (resistance)	Predictive value (susceptibility)	F1-score	Number of markers*
CAZ	GPA+EXPR	0.83 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.82 ± 0.01	37
TOB	GPA+EXPR	0.89 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.92 ± 0.01	59
MEM	GPA+EXPR	0.91 ± 0.02	0.86 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.81 ± 0.03	0.87 ± 0.01	93
CIP	SNPs	0.92 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.90 ± 0.01	50

\*The number of markers indicates the number of (combined) features that resulted in the least complex SVM model within one standard deviation of the peak performance, i.e., with the best macro F1-score and as few as possible features for each drug.



**Ciprofloxacin** - SNP in Quinolone Resistance Determining Region  
*gyrA, parC*

**Tobramycin** – Presence/absence of genes aminosides Modifying enzymes

– Expression of *mexXY* operon ↗

**Méropénème** – Presence/absence des genes *ftsY, oprD, et czcD*

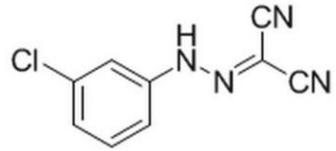
– Expression of *gbuA* ↗ *mexAB* ↗

**Ceftazidime** – Présence/absence des *éléments génétiques mobiles*

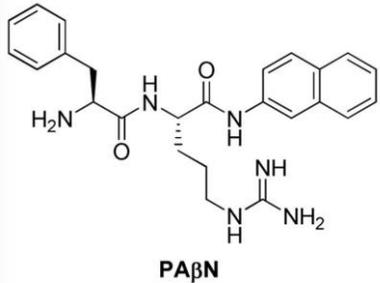
– Expression of *ampC* ↗ , and genes under the control of *ampR* (*fpvA, pvfD, algF* ↗)

# Inhibiteurs d'efflux actif

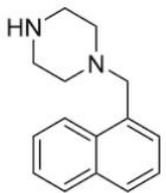
## Inhibiteurs d'efflux anciens



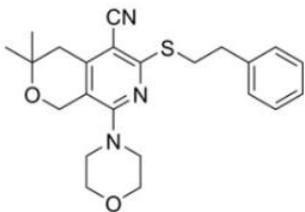
Carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP)  
Inhibiteur de la force proton-motrice



Phenylalanyl arginyl  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N)  
Inhibiteur compétitif substrat



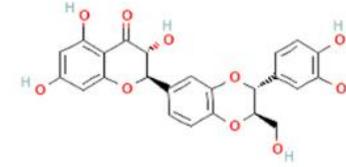
1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine (NMP)



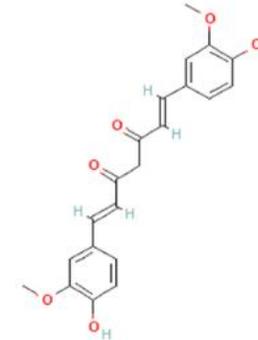
MBX2319, pyrazolopyridine synthétique

## Inhibiteurs d'efflux actuels

*Extraits de plantes, flavonoïdes*

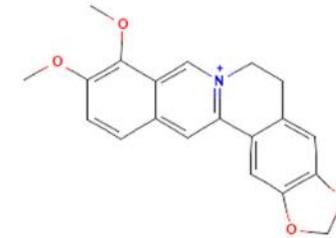


Silybine

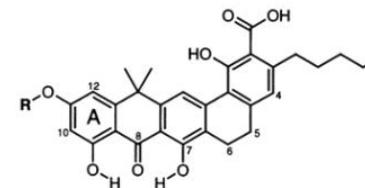


Curcumin

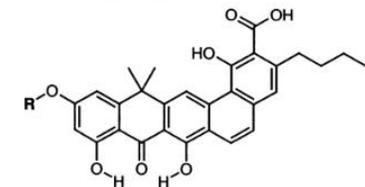
*Alcaloïdes*



Berbérine



EA-371 $\alpha$



EA-371 $\delta$

Extraits de la fermentation  
*Streptomyces*

# Conclusions, l'efflux actif chez les souches cliniques

---

- ✓ Niveaux de résistance conférés par les pompes d'efflux
  - **Faible à modéré** (CMI x 2 - 16)
  - **Contribue** à la résistance aux antibiotiques de haut niveau
- ✓ **Potentialise** d'autres mécanismes de résistance
- ✓ Impact clinique
  - ✓ **Manque de données cliniques !**
  - ✓ Facilite l'émergence de mutants ?
- ✓ Emergence de mutants d'efflux sous traitement
  - ✓ **Résistance croisée** avec plusieurs antibiotiques
  - ✓ Sélection *In vivo* par les **fluoroquinolones**

# Merci pour votre attention

## CNR RA Besançon

- Dr Damien Fournier
- Dr Anaïs Potron
- Dr Xavier Vuillemin
- Maxime Bour
- Pauline Triponney
- Emma Gauthier
- Isabelle Hostalier



Menu ☰

CNR  
RÉSISTANCE AUX  
ANTIBIOTIQUES

Q

Bienvenue sur le site du Centre National de Référence  
de la Résistance aux Antibiotiques

**DÉPOSER**  
une demande d'analyse  
Envoyer votre souche ↓

**ACCÉDER**  
au serveur de résultats  
Email  
Mot de passe  
Mot de passe oublié ?

Les actualités du CNR  
↓



<http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr>