

ANTIBIOTIQUES

Quand la fluorescence s'attaque aux résistances

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, puis son exploitation thérapeutique dans les années 1940, l'utilisation des antibiotiques a permis de traiter des maladies comme la tuberculose ou la lèpre, et l'on estime que les populations ayant accès aux antibiotiques ont gagné 15 ans d'espérance de vie. Mais certaines maladies infectieuses demeurent difficiles à combattre. De plus, dans cette lutte contre les bactéries, celles-ci ont développé de nombreux mécanismes de résistance. Plusieurs équipes, mobilisées autour de ces sujets préoccupants, sont venues sur la ligne de lumière DISCO pour des études en microscopie de fluorescence UV.

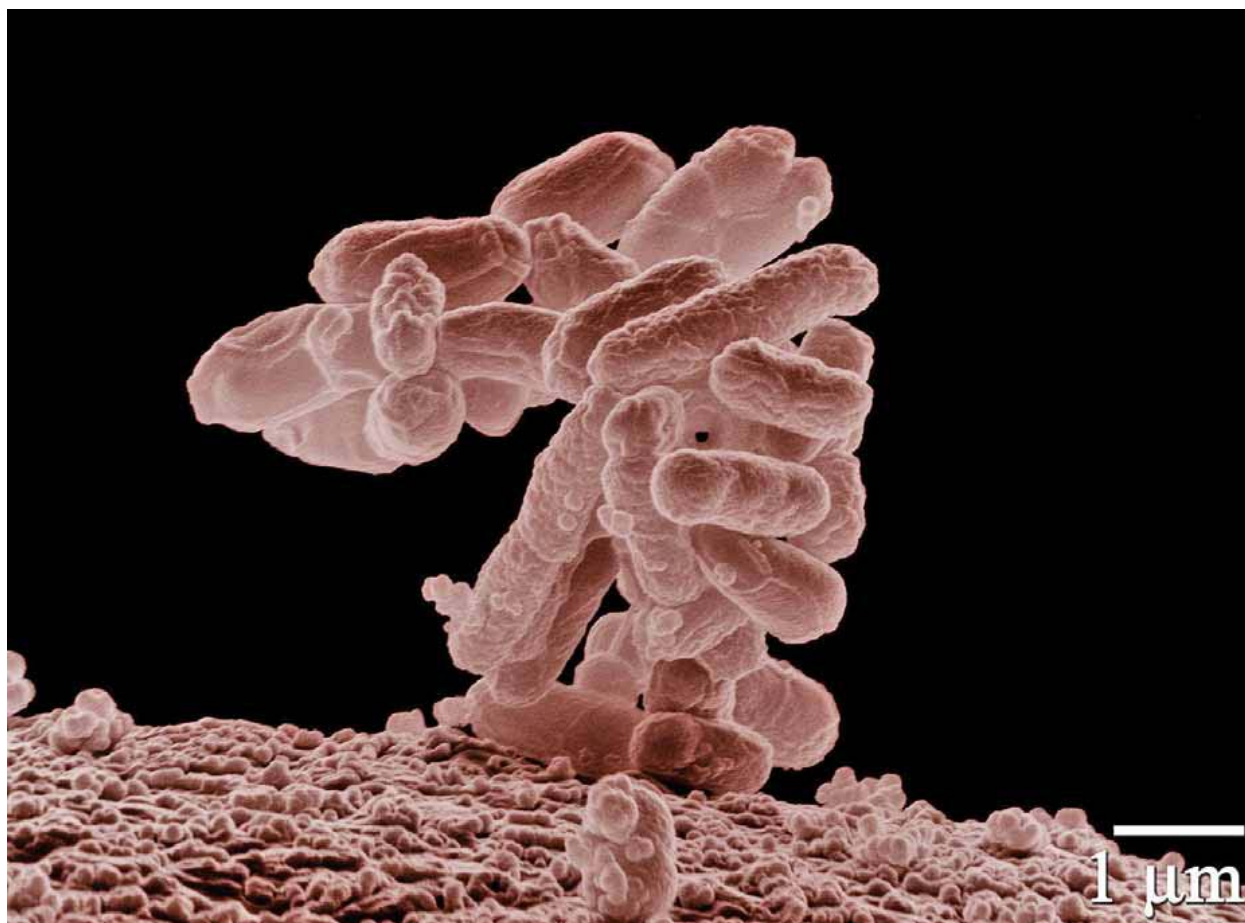


Image d'une colonie de bactéries *E.coli* obtenue par microscopie électronique basse température. Grossissement : 10000 fois.

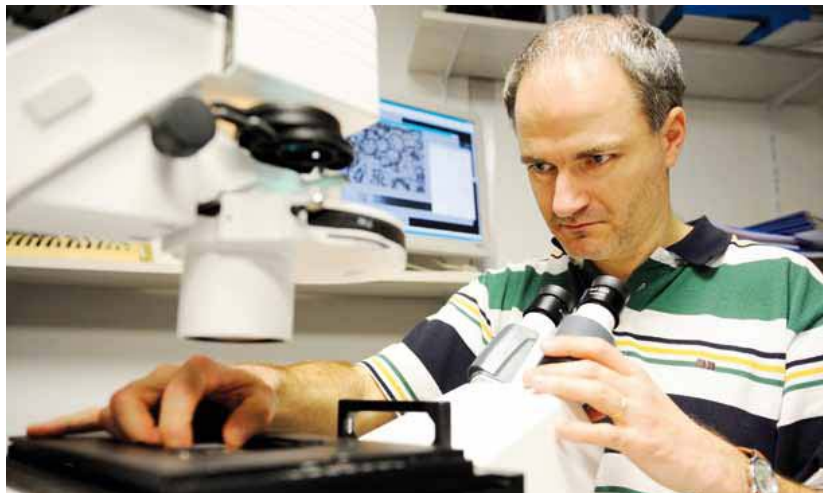
Si, grâce à l'emploi des antibiotiques, de nombreuses maladies infectieuses ont disparu ou ne sont plus mortelles lorsqu'elles sont diagnostiquées, le choix de l'antibiotique à employer demeure un élément crucial. C'est le cas pour l'endocardite, une infection qui touche l'appareil valvulaire cardiaque et se traduit par l'apparition d'une lésion (appelée « végétation »), formée d'un amas de bactéries, de plaquettes sanguines et de protéines

plasmatiques, qui se développe sur l'une des valves cardiaques.

Endocardite : où vont les antibiotiques ?

Le traitement classique de l'endocardite est l'injection intraveineuse de deux antibiotiques différents pendant plusieurs semaines, parfois accompagnée d'une intervention chirurgicale pour exciser la lésion et les abcès associés. La faible efficacité des thérapies dans ce cas est en

grande partie liée au fait que la végétation n'est pas irriguée par des vaisseaux sanguins, aussi les antibiotiques ne sont-ils pas efficacement « acheminés » jusqu'à elle et aux colonies bactériennes. Savoir comment les antibiotiques diffusent au sein des lésions est essentiel pour mieux maîtriser et adapter les traitements de l'endocardite. Or, il existe peu d'études sur leur diffusion au sein des végétations et aucune dans les colonies bactériennes. Pour obtenir



Eric Batard
et le microscope
de DISCO

nir des réponses sur ces aspects, l'équipe d'Eric Batard, de l'Université de Nantes, a choisi de travailler sur deux lignes de lumière de SOLEIL : DISCO et SMIS, afin de combiner la microspectroscopie respectivement dans les domaines de l'UV et de l'IR.

Combiner infrarouge et ultraviolets

Les études en microspectroscopie IR menées sur la ligne SMIS (voir aussi article p24) ont montré qu'il est possible de distinguer les signatures spectrales associées d'une part à la composition biochimique des colonies bactériennes et d'autre part à celle de la végétation, mais aussi que cette composition biochimique est modifiée en présence d'antibiotique. Les chercheurs possèdent donc un premier outil pour suivre l'effet du traitement sur les zones lésées.

Par ailleurs, certaines familles d'antibiotiques possèdent la propriété de fluorescer lorsqu'elles ont été excitées par un faisceau UV, ce qui les rend particulièrement intéressantes dans le cadre d'une étude en microspectroscopie. Mais les tissus vivants peuvent eux aussi être naturellement composés de molécules fluorescentes. Cela signifie que, si l'on analyse un tissu traité aux antibiotiques, les deux types de signaux risquent d'interférer. Avant de suivre la distribution spatiale des antibiotiques administrés aux tissus touchés par l'endocardite, l'équipe d'Eric Batard a donc dû analyser les réponses spectrales des végétations non traitées. Par un choix judicieux d'antibiotique, l'ofloxacin, qui émet à des longueurs d'onde différentes

de celles des tissus malades, les signaux obtenus sont différents pour les tissus traités et non traités. La pertinence de l'emploi de la microspectroscopie de fluorescence UV a ainsi été confirmée.

L'étape suivante consiste à étudier la distribution spatiale de l'antibiotique au sein de la végétation, ainsi que l'influence éventuelle de la localisation des colonies bactériennes sur la diffusion de l'antibiotique dans la lésion. De premiers résultats montrent déjà que l'ofloxacin, effectivement localisé dans les végétations, n'y est pas présent de façon homogène. La résolution spatiale des images réalisées sur DISCO - une centaine de nanomètres - permettra de préciser ces données à l'échelle de la colonie bactérienne.

Un problème majeur de santé publique

La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue de nos jours un problème majeur de santé publique en Europe et dans le monde. Les infections nosocomiales, c'est-à-dire acquises à l'hôpital, sont la conséquence de l'adaptation des bactéries aux traitements antibiotiques très largement utilisés. De multiples mécanismes se sont développés chez ces microorganismes, à différents niveaux : l'antibiotique doit d'abord traverser la membrane de la bactérie, or ce passage peut être limité par une modification de la membrane, ou contrebalancé par un efflux de l'antibiotique présent dans la bactérie, grâce à la présence de pompes membranaires. L'efficacité thérapeutique peut également être diminuée par des enzymes bactériennes

qui dégradent l'antibiotique ou des mécanismes qui diminuent son action (ex : mutation de la molécule cible sur laquelle doit se fixer l'antibiotique).

Si l'existence de ces « protections » mises en place par les bactéries est connue, beaucoup d'informations manquent encore concernant les processus biophysiques et biologiques impliqués. L'équipe de Jean-Marie Pagès, de l'Université de la Méditerranée (Marseille), focalise son attention sur l'étape de transport de la molécule d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie. Par microspectroscopie de fluorescence UV, la présence d'antibiotique est suivie dans différentes bactéries, choisies pour les propriétés particulières de leur membrane : les protéines de transport impliquées dans « l'entrée de l'antibiotique » sont modifiées, ce qui a pour conséquence de rendre la bactérie résistante. De plus, sont également utilisés des composés chimiques capables d'inhiber la résistance de ces bactéries aux antibiotiques.

Des bactéries résistantes livrent leurs secrets

L'approche de l'équipe de Jean-Marie Pagès consiste à tester des concentrations croissantes d'antibiotique sur les bactéries résistantes, en présence ou non des composés chimiques cités précédemment. Grâce aux performances de la ligne DISCO, il est possible d'observer précisément l'endroit où les molécules d'antibiotique sont localisées au sein de la bactérie : membrane, cytoplasme... En testant plusieurs souches bactériennes, les scientifiques cherchent à obtenir une définition moléculaire complète du mécanisme de résistance aux antibiotiques mis en jeu, ainsi que des processus qui peuvent contrer ce mécanisme.

Les chercheurs attendent beaucoup de ces méthodes d'investigation biophysiques qui devraient bientôt apporter de nouvelles armes contre les infections bactériennes, une lutte toujours d'actualité.

→ Contacts :

ebatard@chu-nantes.fr

jean-marie.pages@univmed.fr

matthieu.refregiers@synchrotron-soleil.fr