

Persistence versus Resistance : quel impact en pratique ?

Rémi Le Guern

MCU-PH en Bactériologie

CHU Lille

Persisters

- Un concept ancien, toujours d'actualité
- Joseph Bigger, 1944 : découvre que certains *Staphylococcus aureus* survivent à de fortes doses de pénicilline
 - > une sous-population échappe au traitement malgré une sensibilité apparente
- **Hétérogène (une sous-population uniquement)**
- **Adaptation phénotypique (différent de la résistance)**

PRESENCE OF PERSISTERS

The only hypothesis which seems to explain the occurrence of a small number of survivors out of the millions of cocci originally present is that these differ from the majority of their fellows in that they are capable of surviving a concentration of penicillin which, in the time of action allowed, kills the others.

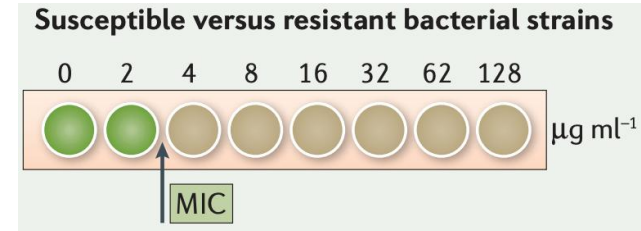
Cocci with no greater resistance to penicillin than normal but which happen to be, when exposed to it, in a phase in which they are insusceptible to its action.

Souche sensible

- **Souche sensible à un antibiotique**

Définition : Une souche bactérienne est dite sensible à un antibiotique si celui-ci est capable d'inhiber sa croissance à des concentrations atteignables dans l'organisme avec un traitement standard.

Critère microbiologique : Concentration minimale inhibitrice (CMI) basse, en dessous de la valeur seuil définie par l'EUCAST ou le CLSI.



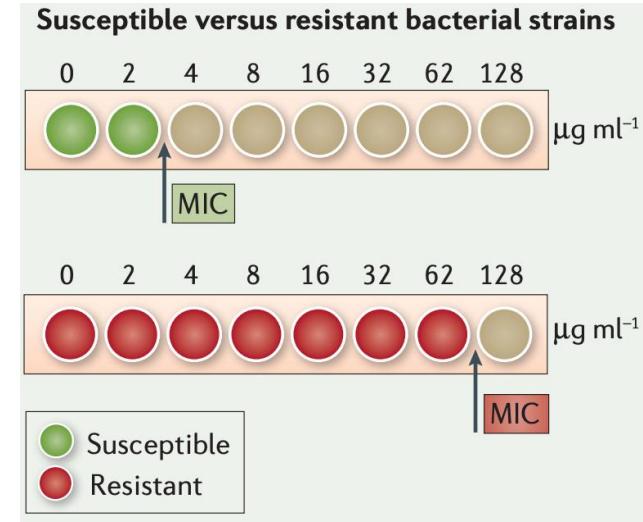
Souche résistante

- **Souche résistante à un antibiotique**

Définition : Une souche est résistante si elle peut se multiplier malgré la présence d'un antibiotique à des concentrations habituellement efficaces.

Critère microbiologique : CMI élevée, au-dessus des seuils de sensibilité.

Cette augmentation de la CMI est due à des **mécanismes génétiques stables**, tels que la production d'enzymes inactivant l'antibiotique (β -lactamases), la modification de la cible de l'antibiotique (ex : PBP2a chez le SARM), ou encore l'activation de pompes d'efflux.



Souche tolérante

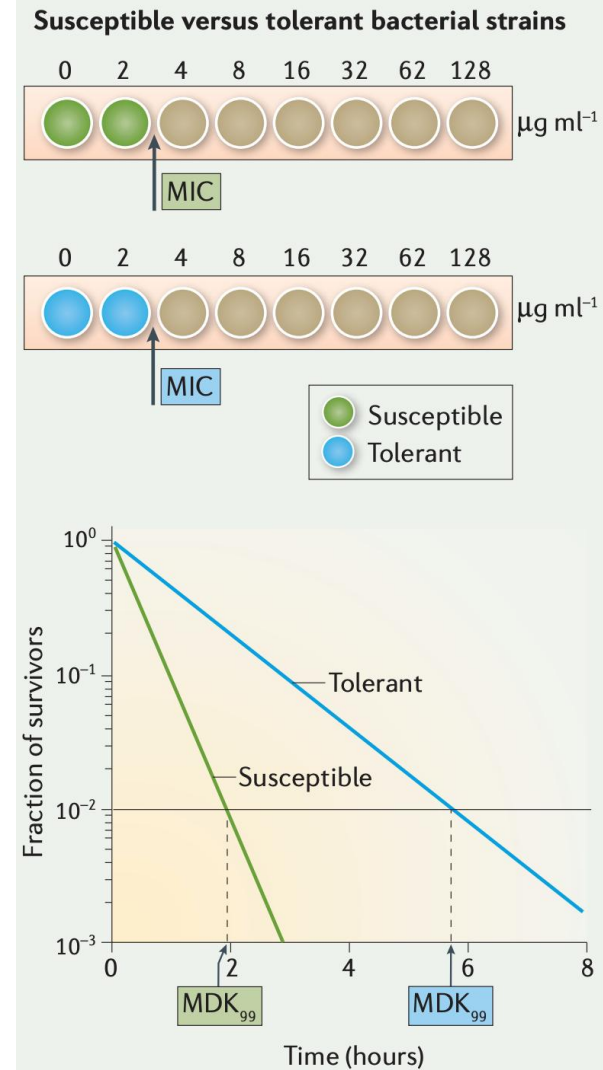
- **Souche tolérante à un antibiotique**

Définition : Contrairement à la résistance, une souche tolérante ne présente aucune augmentation de la CMI. Cependant, elle nécessite un temps plus long pour être éradiquée.

Critère microbiologique : Augmentation du Minimum Duration for Killing (MDK), le temps minimal nécessaire pour tuer une fraction déterminée de la population bactérienne. La CMI reste inchangée.

MDK₉₉ = durée nécessaire pour tuer 99 % des bactéries d'une population

Cela résulte souvent d'un **ralentissement du métabolisme bactérien** ou d'un passage à un état stationnaire, limitant l'effet des antibiotiques qui ciblent des processus actifs (comme la division cellulaire).



Souche persistante (persistier)

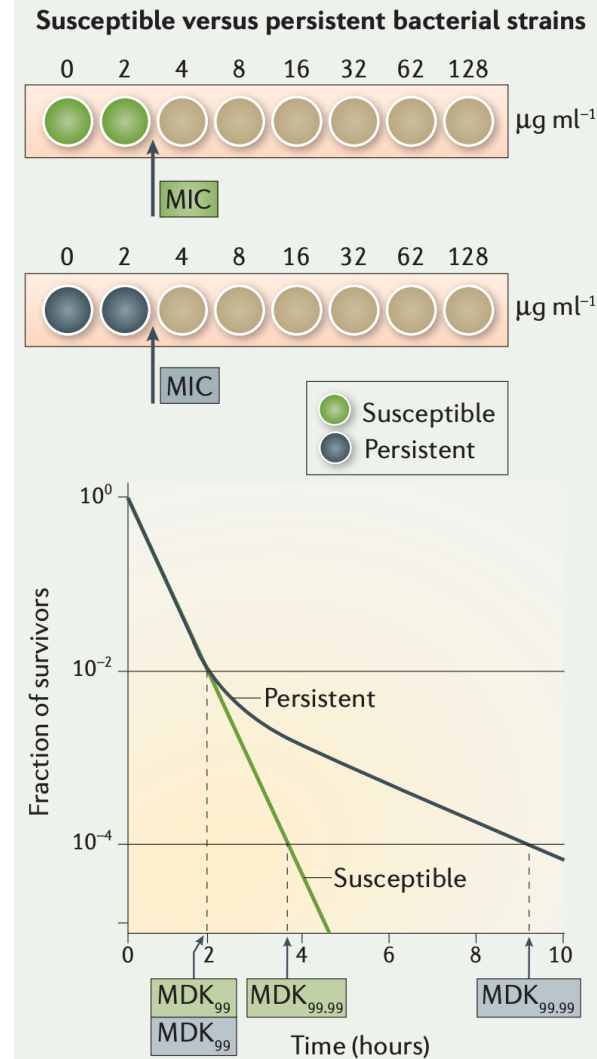
- **Souche persistante (persistier)**

Définition : La persistance est une **forme hétérogène de tolérance**, où une sous-population bactérienne survit à un traitement antibiotique prolongé. Une fois l'antibiotique retiré, ces persisters redonnent une population sensible.

Critère microbiologique : Courbe de mortalité biphasique : la majorité des bactéries sont tuées rapidement, mais une fraction survit beaucoup plus longtemps.

La population persistier est non-héritée : après repiquage, la sensibilité initiale est restaurée.

C'est une **adaptation phénotypique** sans modifications génétiques.



Quatre profils bactériens : à ne pas confondre

Caractéristique	Sensibilité	Résistance	Tolérance	Persistance
CMI	Basse	Élevée	Basse	Basse
MDK (temps de survie)	Normal	Non pertinent	Augmenté	Très augmenté (sous-population)
Transmission	Non applicable	Génétique	Peut être génétique ou environnemental	Non génétique
Population concernée	Toute	Toute	Toute	Sous-population

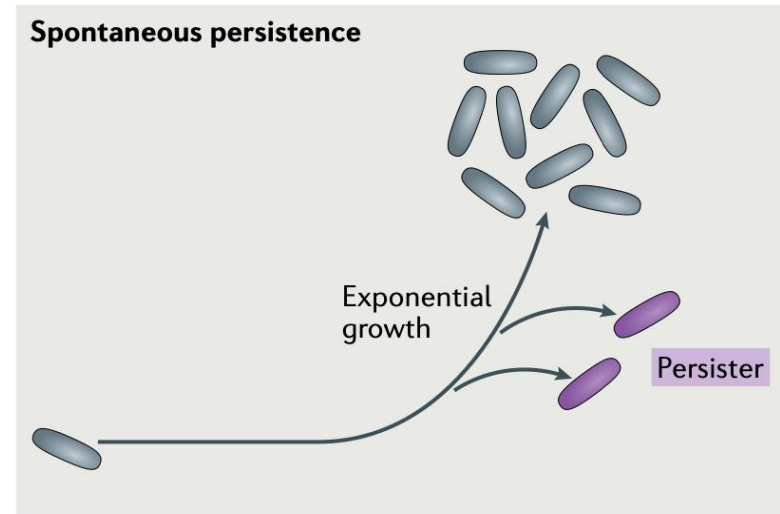
Persistence spontanée

Définition : La persistance spontanée correspond à l'apparition aléatoire de persisters au sein d'une population bactérienne en croissance exponentielle, sans qu'aucun signal extérieur ne soit nécessaire.

Mécanisme : L'apparition de persisters spontanée est souvent due à une régulation stochastique (aléatoire) de l'expression des toxines-antitoxines ou à des fluctuations métaboliques entraînant une entrée en dormance.

En pratique : Lorsqu'une culture en croissance exponentielle est directement exposée à un antibiotique bactéricide (comme un β -lactamine ou une fluoroquinolone), une fraction très faible ($\approx 10^{-6}$ à 10^{-4}) des bactéries survit sous forme de persisters.

Variation aléatoire du métabolisme



*Brauner
Nat Rev Microb 2016*

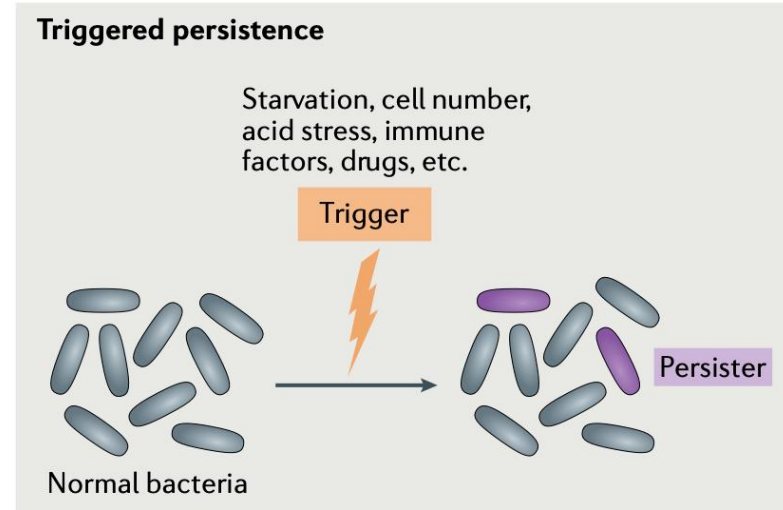
Persistence induite

Définition : La persistance induite est déclenchée par un facteur de stress environnemental.

Mécanismes :

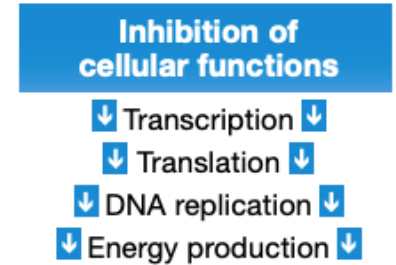
- **Privation de nutriments** (ex. carence en acides aminés, carbone ou fer).
- **Stress acide ou oxydatif** (ex. conditions dans le phagosome des macrophages).
- **Signal de quorum sensing** (ex. biofilms bactériens avec forte densité bactérienne).
- **Réponse aux antibiotiques eux-mêmes** (certains antibiotiques peuvent déclencher un stress et induire des persisters).

En pratique : Le milieu extérieur (conditions locales chez l'hôte) peut contribuer à la survenue de persisters.



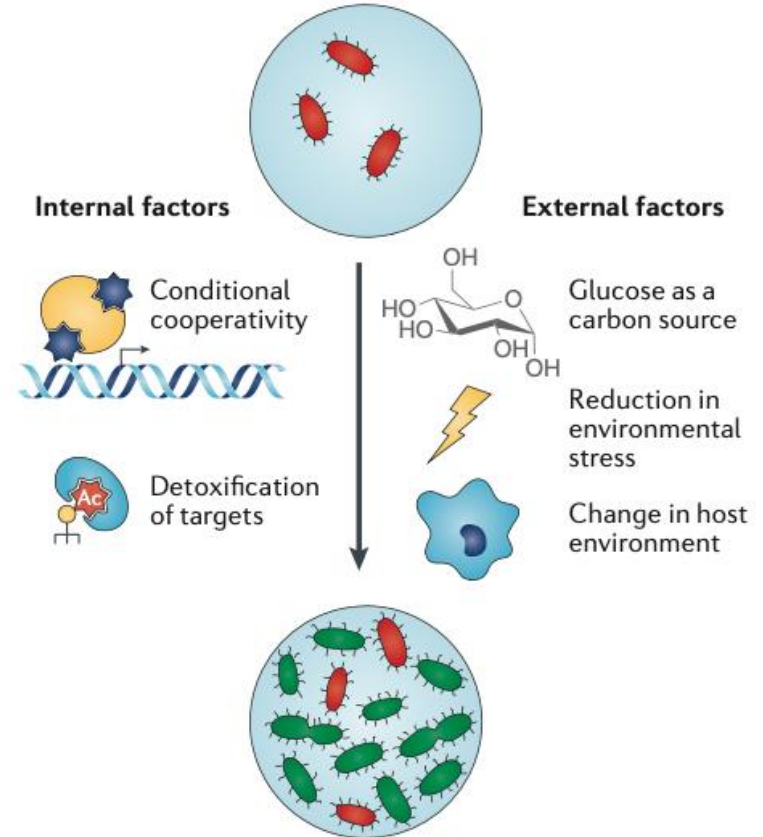
Pourquoi les persisters survivent ?

- **Métabolisme ralenti** : Certaines bactéries ralentissent leur synthèse protéique et diminuent leur production d'ATP, réduisant ainsi la sensibilité aux antibiotiques.
- **Systèmes toxine-antitoxine** : Certains opérons bactériens produisent des toxines intracellulaires qui inhibent la croissance et maintiennent l'état dormant des persisters. Plusieurs cibles: transcription, réplication ADN...
- **Réponse au stress via (p)ppGpp** : Le stress oxydatif, la carence en nutriments ou les signaux environnementaux peuvent induire un état persistant via des régulateurs tels que (p)ppGpp (guanosine tétraphosphate/pentaphosphate), qui modulent la réponse au stress et l'entrée en dormance. C'est la **réponse stringente** (*stringent response*), fréquemment retrouvée dans les biofilms.



Comment les persisters reviennent-ils à la vie ?

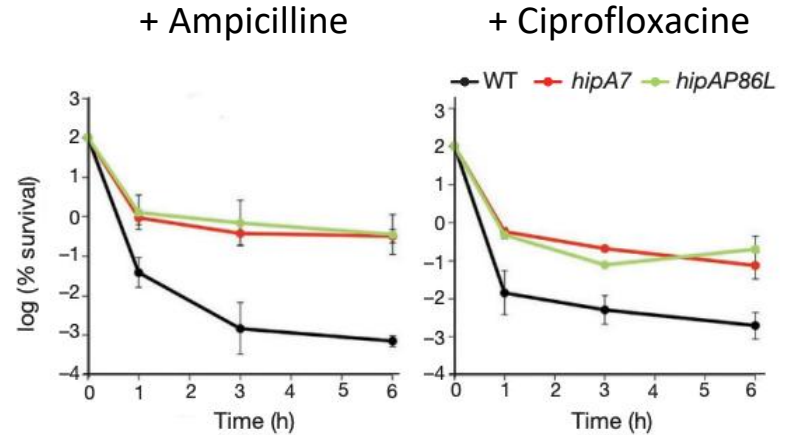
- **Reprise du métabolisme** : disponibilité des nutriments clefs
- **Systèmes toxine-antitoxine** : neutralisation des toxines produites par le système toxine-antitoxine: soit par l'anti-toxine, ou peuvent être clivées par des enzymes, ou modifications post-traductionnelles.
- **Réponse au stress** : diminution des stress environnementaux (réponse immunitaire affaiblie, diminution de la concentration en antibiotiques)



Cas particulier des bactéries « high-persister mutant »

- Mutation dans *hipA* chez *Escherichia coli* : phénotype hyperpersister ($\uparrow 1000x$) en augmentant l'activité de HipA
- Module toxine-antitoxine HipA/HipB :
Toxine HipA : blocage synthèse protéique (induit état de dormance)
Antitoxine HipB : régulateur
- Rare mais présent en clinique (ex. IU à *E. coli*)

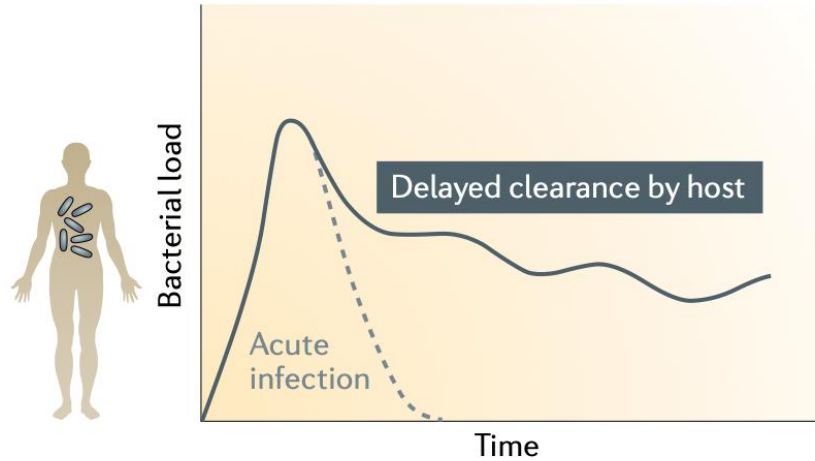
⚠ Cas particulier, en règle générale la persistance n'est pas génétique +++



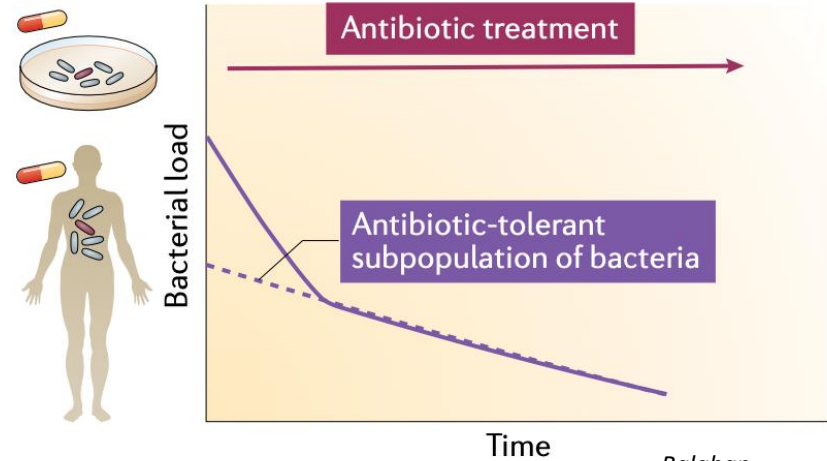
Mutants de *hipA* : souches cliniques de *E. coli* isolées d'infection urinaires (phénotype high-persister)

Infection persistante ≠ Persisters

Persistent infection



Antibiotic persistence



Balaban
Nat Rev Microb 2019

Infection qui persiste malgré le traitement et le système immunitaire

Ex: Infection sur biofilm, infection intracellulaire, site d'infection difficile d'accès pour les antibiotiques

Souche bactérienne produisant une proportion élevée de persisters

Ex: *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose



Persisters: pourquoi c'est important ?

- **Mise en évidence difficile des persisters**
Facile de mettre en évidence la résistance (CMI)
Mais pas de test en routine pour la persistance
-> rechutes sans résistance détectable
- **Rôle de l'environnement** : le biofilm peut être un responsable d'un échec thérapeutique par lui-même, mais aussi favoriser l'émergence de persisters.
-> biofilm = sanctuaire à persisters
- **Persistance = tremplin vers la résistance ?** les persisters survivant à une antibiothérapie prolongée peuvent finir par développer des mutations et évoluer vers une souche résistante aux antibiotiques
-> favorise émergence de mutants résistants



Microenvironnement infectieux : un facteur clé

- **Microenvironnement infectieux** : influe réponse bactérienne aux antibiotiques +++
- **Antibiogramme** : conditions standardisées, bactéries en phase de croissance exponentielle. Surtout adapté pour les infections aiguës.
- **Prise en compte des conditions locales** de l'infection (pH, hypoxie, substrats limitants) à développer en recherche pour les infections chroniques ?
- **Parallèle avec le microenvironnement tumoral** avec des modèles 3D (organoïdes) développés pour tester l'efficacité des chimiothérapies

 Antibiogramme (<i>in vitro</i>)	 Infection réelle (<i>in vivo</i>)
Bactéries en croissance rapide (phase exponentielle)	Bactéries parfois dormantes ou en phase stationnaire
Milieu nutritif optimal, pH neutre, oxygène disponible	pH acide, hypoxie, carence en nutriments
Antibiotiques testés dans des conditions standardisées	Conditions locales variables (site infectieux, hôte)
Pas de biofilm	Présence fréquente de biofilms
Pas de pression immunitaire	Influence du système immunitaire
Évaluation individuelle de chaque antibiotique	Synergies ou antagonismes en situation réelle

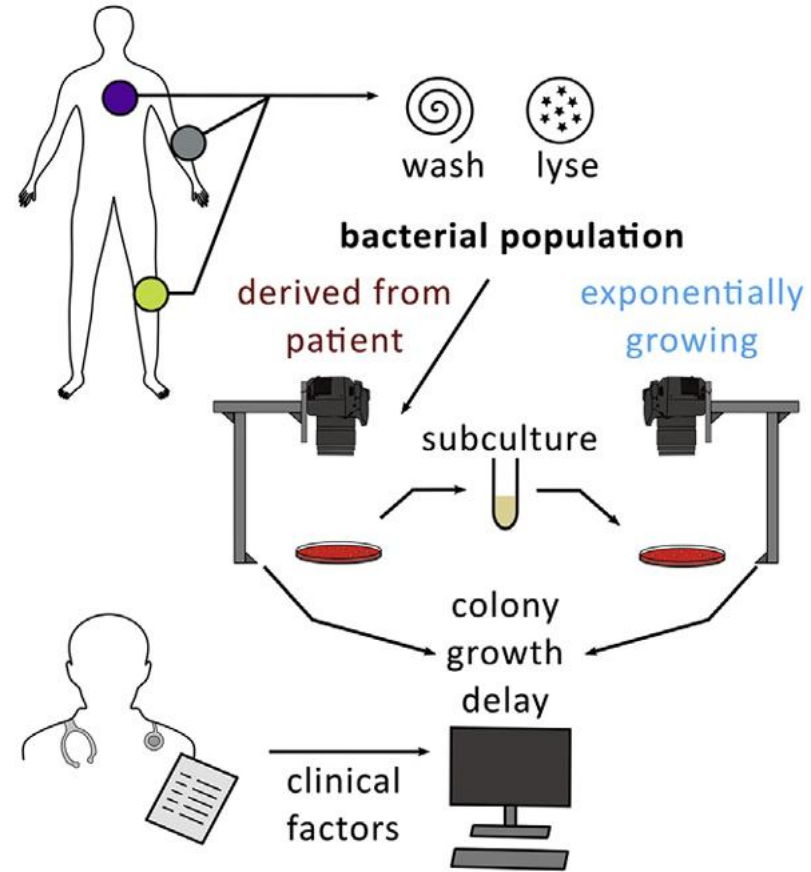
Staphylococcus aureus et persisters

Echantillons : 132 prélèvements de patients atteints d'infections difficiles à traiter (bactériémies, infections ostéo-articulaires, infections cardiovasculaires).

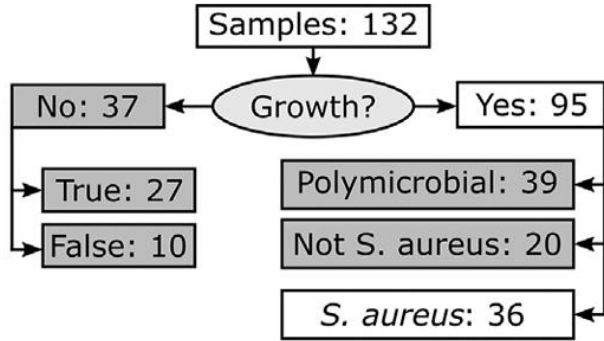
Suivi de la croissance des colonies par imagerie en **time-lapse**.

Les persisters sont métaboliquement dormants ou très ralentis, ce qui entraîne un retard important dans la reprise de croissance après élimination du stress antibiotique.

En ensemencant directement les bactéries issues des prélèvements patients sur un milieu riche, on s'attend à ce que les bactéries "classiques" forment des colonies rapidement, tandis que les persisters mettront plus de temps à former des colonies visibles.

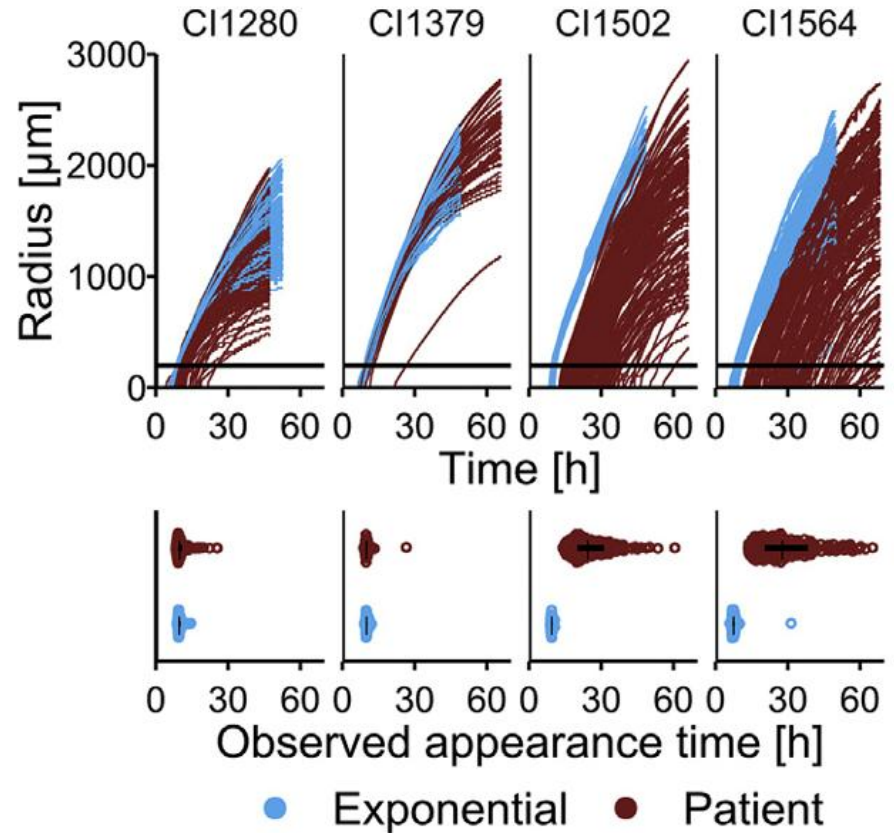


Staphylococcus aureus et persisters

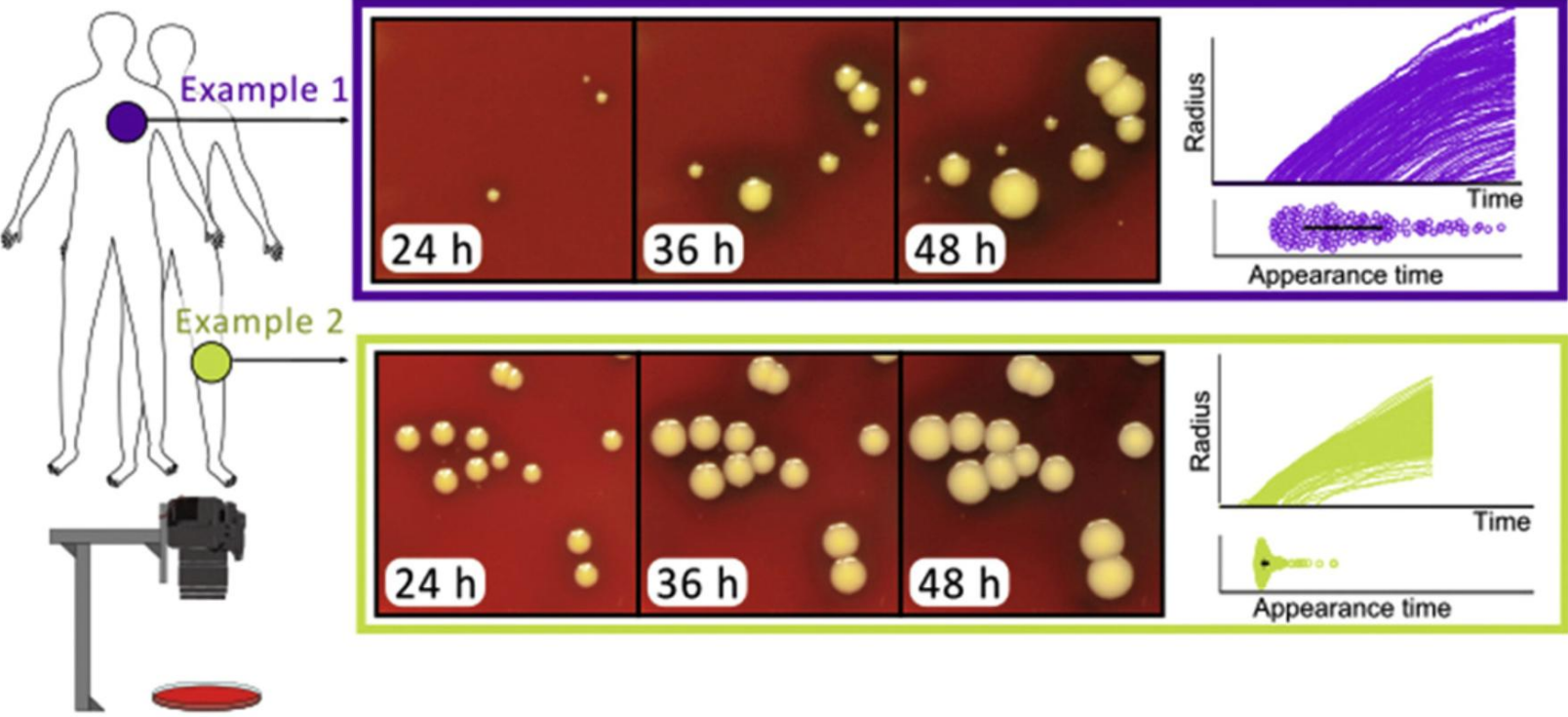


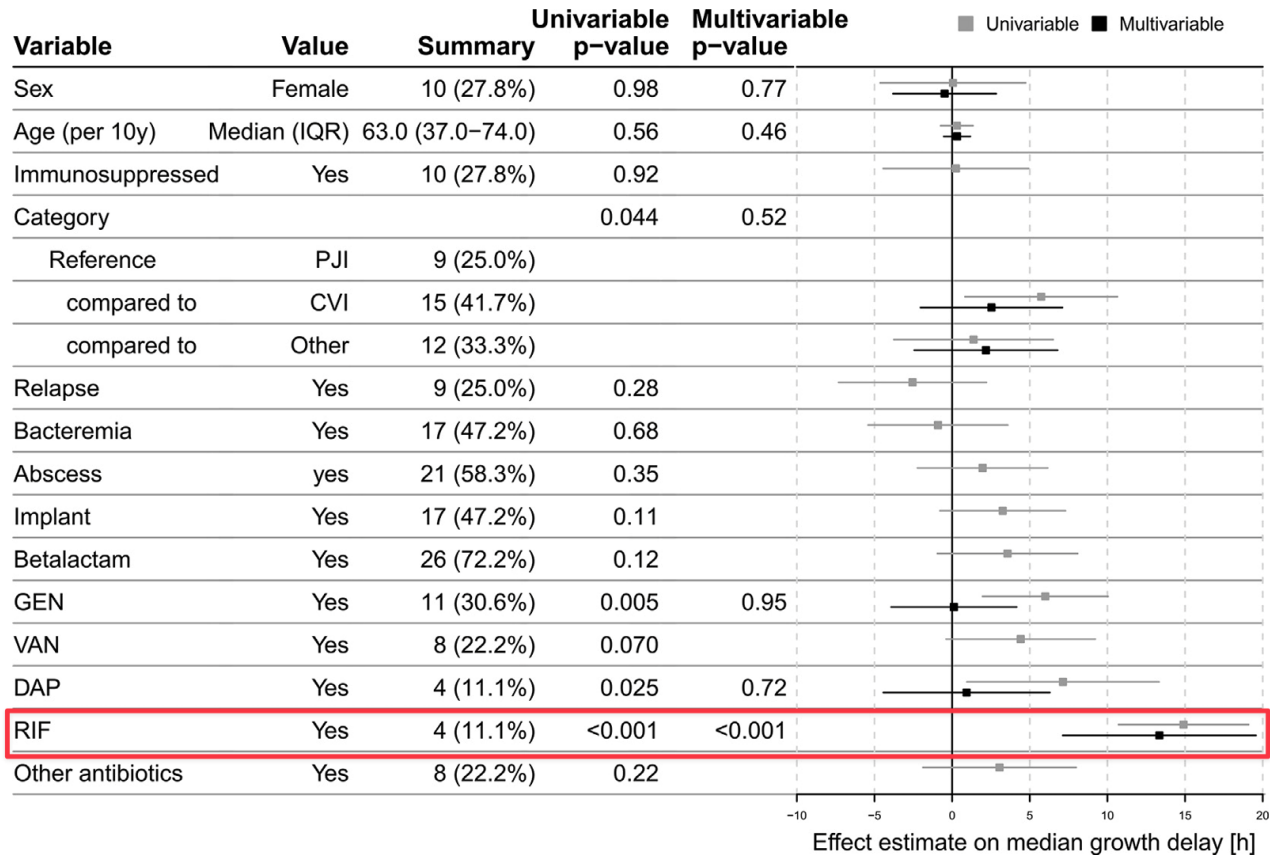
Colonies issues des prélèvements patients :
croissance retardée, hétérogénéité phénotypique.

Colonies issues d'une culture exponentielle
(contrôle) : croissance homogène, sans retard
significatif.



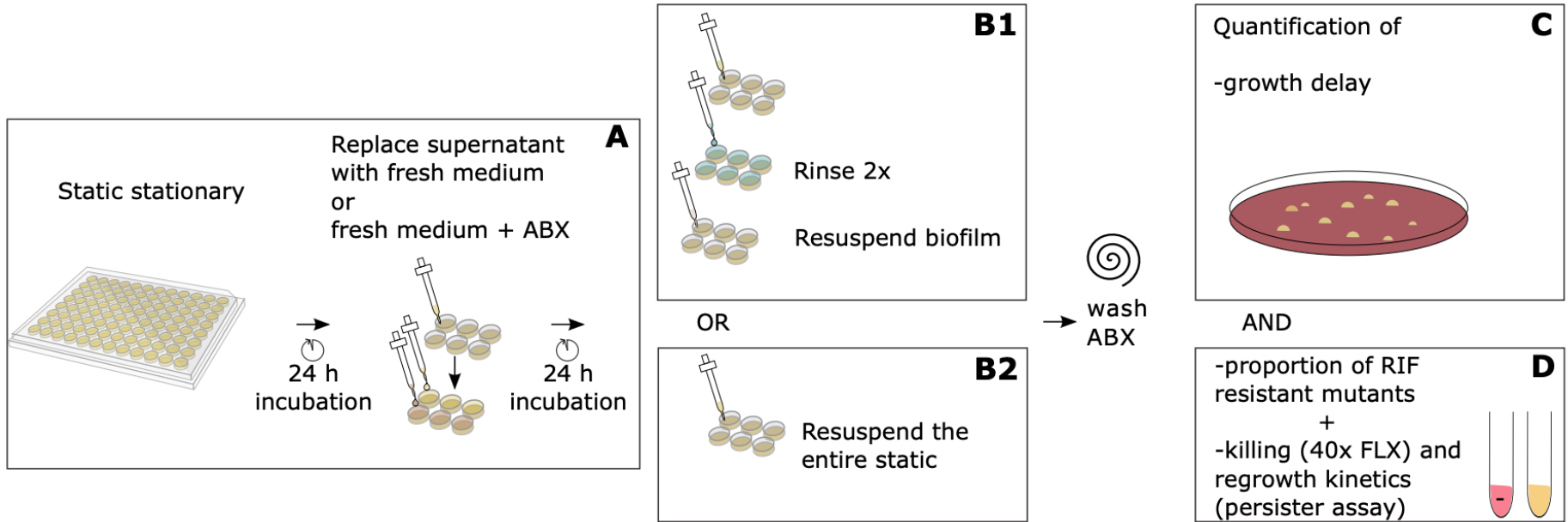
Staphylococcus aureus et persisters

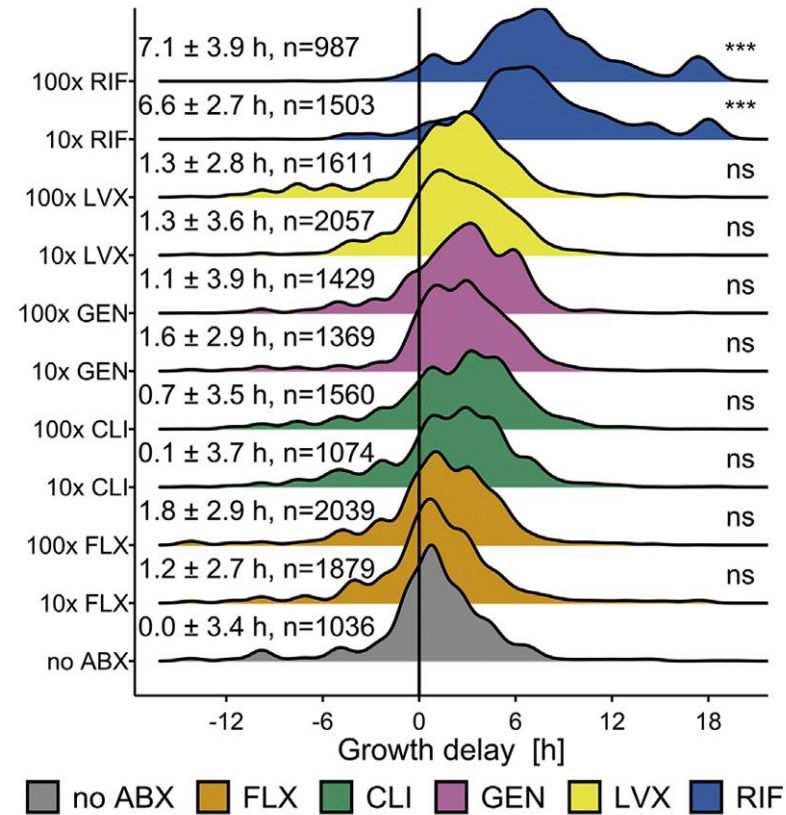
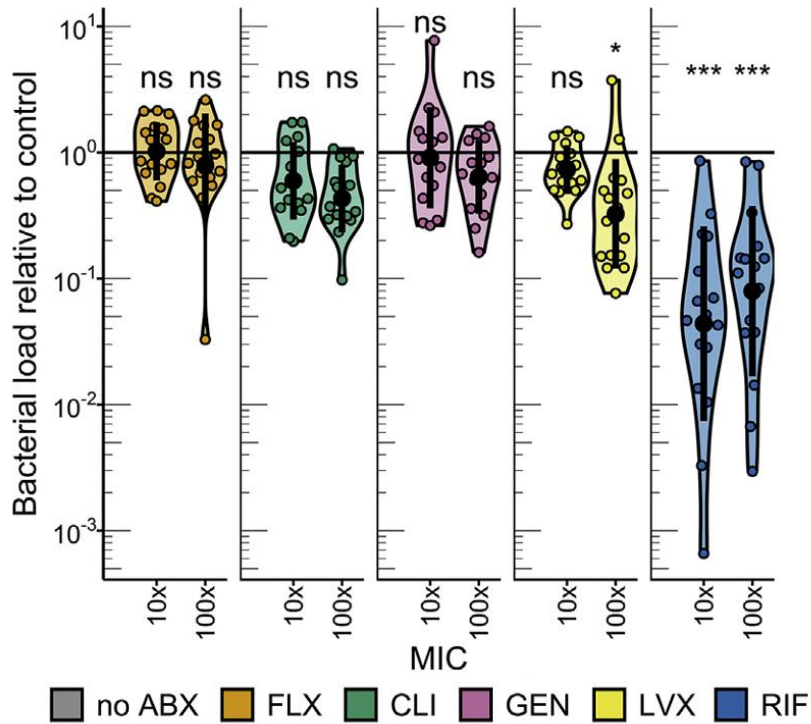




Rifampicine: facteur le plus fortement associé à une augmentation du retard de croissance médian (+13,3 h ; IC95% : 7,13–19,6 h ; p < 0,001).

Modèle statique de biofilm cultivé *in vitro* dans des microplaques de 96 puits





Rifampicine réduit fortement la charge bactérienne du biofilm

Les bactéries survivantes présentaient un retard de croissance significatif, suggérant un état de dormance.

Persisters : options thérapeutiques ?

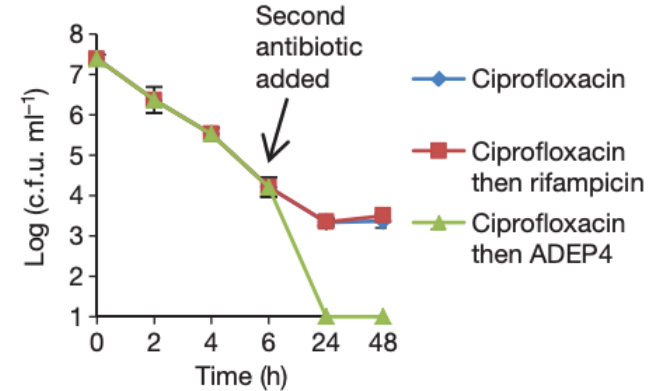
Réveiller les persisters

- **Sucres** (glucose, fructose, mannitol), **substrats métaboliques** (succinate, fumarate) : efficace *in vitro* sur *P. aeruginosa* mais difficile à utiliser *in vivo*...

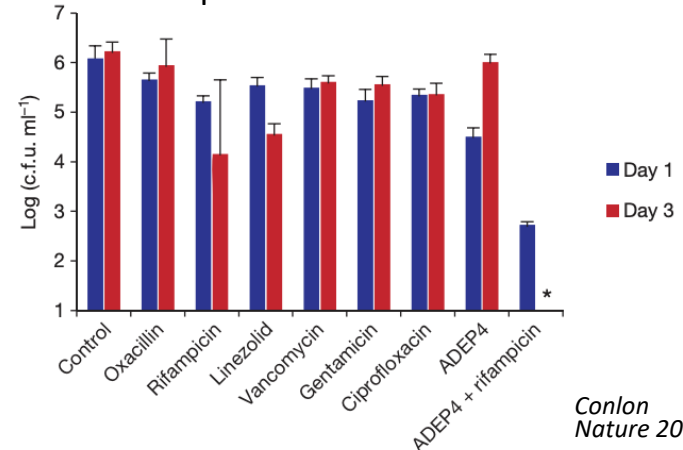
Tuer les persisters

- les antibiotiques de la classe des **acyldepsipeptides**, comme ADEP4. Spectre Gram +. ADEP: active une protéase bactérienne (ClpP), entraînant une dégradation incontrôlée des protéines essentielles à la survie bactérienne. Résultats prometteurs chez la souris neutropénique, mais pas de données chez l'homme. **Toxicité mitochondrie?**

Pas de nouvelle molécule qui pourrait être utilisée spécifiquement dans un avenir proche



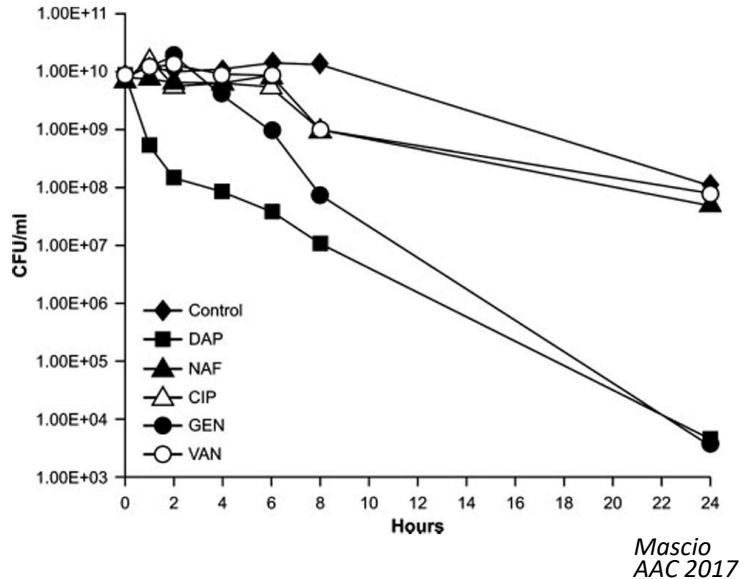
ADEP4 + rifampicine sur biofilm de *S. aureus*



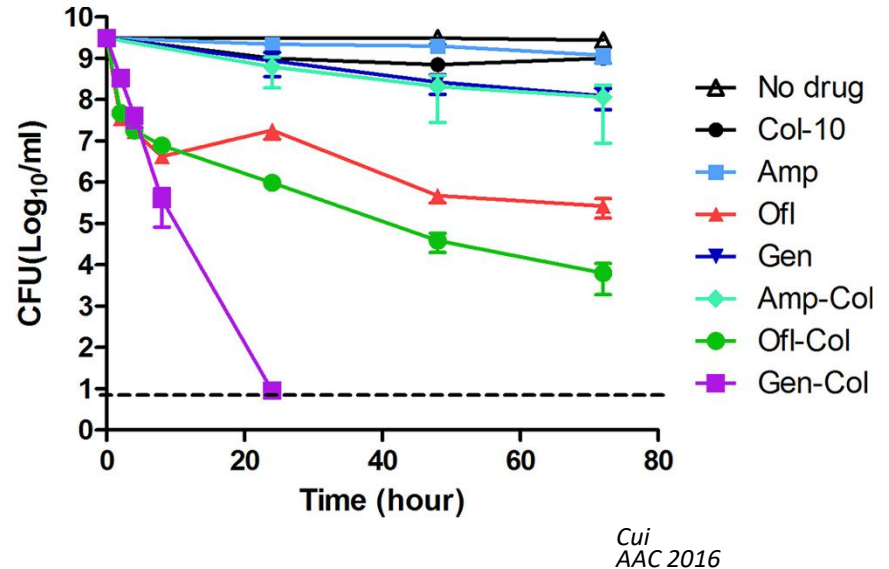
Persisters : options thérapeutiques ?

Antibiotiques agissant sur la membrane

Daptomycine : efficace sur *S. aureus* en phase stationnaire de croissance



Colistine : efficace sur *Escherichia coli* en phase stationnaire de croissance



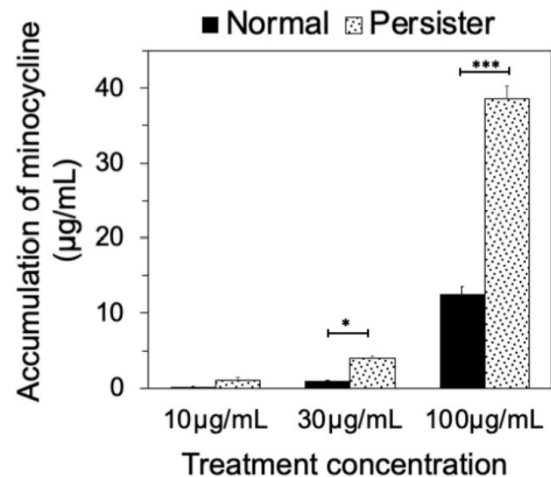
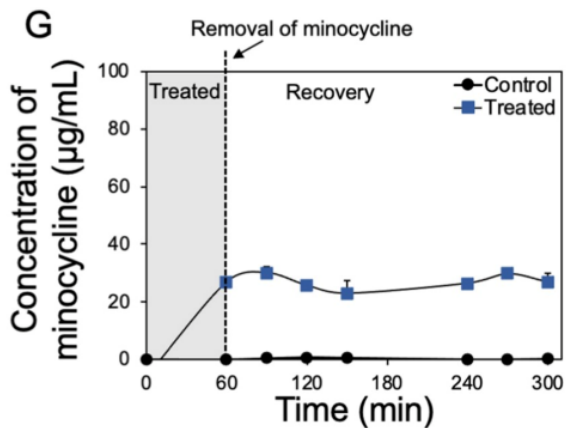
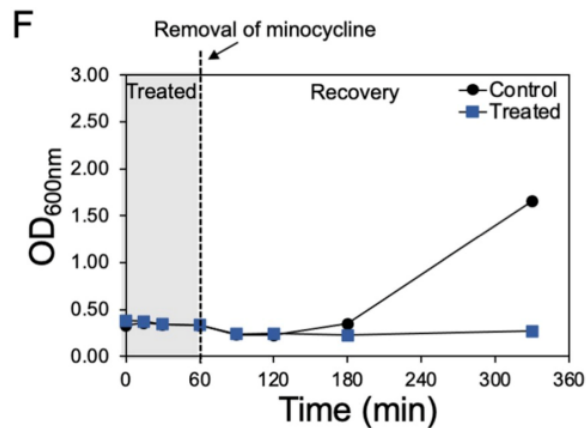
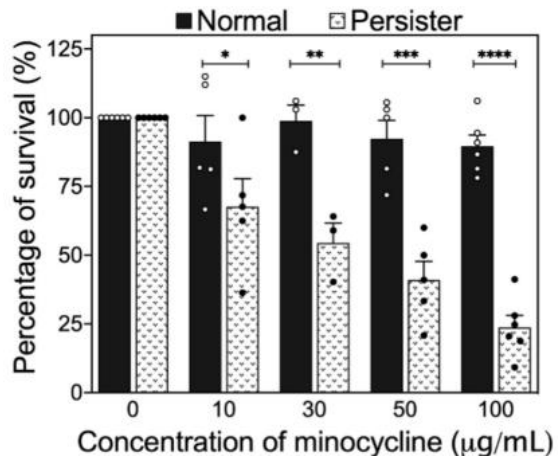
Données expérimentales sur des bactéries en phase stationnaire

Persisters : options thérapeutiques ?

Minocycline et eravacycline seraient efficaces sur les persisters d'*Escherichia coli* (souche hyperpersister *hipA7*)

Activité réduite des pompes efflux chez les persisters
-> accumulation de minocycline en intracellulaire

La minocycline devient active quand la bactérie se « réveille »



Données expérimentales sur des bactéries « persister » (sélection par ampicilline)

Persisters : ce qu'il faut retenir

- **Invisible au labo, redoutable en clinique**

Pas de diagnostic standard, mais rôle suspecté dans les échecs thérapeutiques

Fréquemment impliqués dans les infections chroniques et biofilms

- **Mécanisme phénotypique, pas génétique**

Forme hétérogène de tolérance, non héritée

Dormance métabolique, adaptation au stress, souvent transitoire

- **Et en pratique ?**

Prolonger l'antibiothérapie

Utiliser des molécules efficaces en phase stationnaire ? (daptomycine, colistine)

Cibler le biofilm ? (rifampicine)

Rôle des cyclines ? (minocycline, eravacycline)

Et surtout : **maîtriser le foyer infectieux !**