

Résistance aux médicaments et aux pesticides (biocides) Prospectives scientifiques

Nicole Pasteur, directeur de recherche
Institut des Sciences de l'Evolution, UMR5554, Université Montpellier 2

Le contexte

Les progrès considérables de la Santé des populations humaines au cours du 20ème siècle ont été largement dus au développement et à la mise sur le marché de composés « biocides » (médicaments et pesticides). Ces composés permettent d'éliminer les organismes indésirables qui induisent des pathologies chez l'homme ou affectent les ressources vivantes, animales ou végétales, dont il dépend. Ainsi, les biocides sont utilisés pour lutter contre les agents pathogènes (virus, bactéries, protozoaires ou métazoaires) ou les vecteurs de ces pathogènes, contre les ravageurs des cultures, et contre la prolifération cellulaire (cancer). Ils incluent les produits anti-bactériens, anti-parasitaires, anti-cancéreux, ainsi que les pesticides (insecticides et herbicides, par exemple).

L'efficacité d'un grand nombre de biocides est aujourd'hui compromise par l'apparition de phénomènes de résistance correspondant à la capacité des organismes visés à survivre en présence de concentrations de biocide normalement létales. Ces phénomènes de résistance sont observés dans un nombre d'espèces toujours croissant et, pour chaque espèce, concernent des régions de plus en plus vastes suite à la mondialisation des transports. Sachant que les ravageurs des cultures sont responsables de plus de 30% de la perte des productions agricoles, les maladies infectieuses du tiers de la mortalité annuelle mondiale (WHO 2001) et que plus de 95% des échecs aux traitements anti-cancéreux sont attribués à des résistances, il est clair que les phénomènes de résistance aux biocides sont une préoccupation importante en agronomie et en santé publique.

Un des défis du futur est d'éviter ou de limiter leur impact négatif au niveau curatif individuel, au niveau de la santé des populations humaines (endémies, infections microbiennes, cancer, nutrition par le biais de la protection des cultures, ...) et, plus généralement, au niveau économique des pays et de la planète.

Origine de la résistance : un phénomène adaptatif.

Les "biocides" sont des composés chimiques obtenus par synthèse ou extraits d'organismes (le plus souvent des micro-organismes) qui, en se combinant avec une cible moléculaire (protéine), diminuent ou interrompent son activité physiologique normale, entraînant ainsi la mort de l'organisme visé. La résistance est une adaptation génétique de l'organisme ciblé suite aux modifications de l'environnement dans lequel il vit : elle est le résultat de la sélection des individus qui ont la plus grande probabilité de se reproduire en présence du biocide. Cette probabilité, appelée valeur adaptative ou fitness, varie entre individus d'une même population en fonction du nombre et de la nature des gènes de résistance qu'ils portent. Elle dépend aussi de la pression de sélection exercée par le milieu, c'est-à-dire de la concentration du biocide.

Nature des gènes de résistance.

Pour un biocide particulier (ou une famille de biocides), deux mécanismes de résistance sont fréquemment sélectionnés: la diminution d'affinité de la cible moléculaire vis-à-vis du biocide, et l'augmentation de l'efficacité de la détoxification par dégradation, "capture" ou excrétion. D'autres mécanismes ont aussi été décrits, telles la diminution de la pénétration dans les cellules ou dans l'organisme, la modification du comportement (évitement chez animaux, tendance à une organisation spatiale protégeant la majorité des individus d'une population comme les biofilms bactériens). Au niveau génétique, ces modifications correspondent à des mutations ponctuelles (affectant les gènes de structure ou leur expression) ou à des

duplications géniques. Ces mutations, favorables en présence de biocide, sont transmises de générations en générations. Des gènes codant différents mécanismes de résistance à un même biocide ou à des biocides distincts peuvent s'accumuler chez une même espèce, donnant naissance à de nouveaux génotypes résistants à de multiples biocides. Le profil de l'évolution de la résistance dans le temps et dans l'espace est semblable chez la plupart des organismes et pour tous les biocides. La résistance, quand elle apparaît, est localisée à une zone géographique limitée, puis elle s'étend progressivement et peut concerner l'ensemble de l'espèce. Une exception notable concerne les bactéries où des échanges génétiques entre espèces ou entre groupes écologiques peuvent se faire *via* des éléments mobiles (bactériophages, plasmides, ADN nu ou transposons). Ce phénomène est responsable de l'apparition soudaine de résistances multiples très élevées.

Pression de sélection et valeur adaptative (fitness).

En absence de biocide, les individus résistants montrent, en règle générale, une valeur adaptative réduite par rapport aux individus sensibles. Cela explique pourquoi, avant l'utilisation des biocides, les mutations induisant une résistance avaient une fréquence très faible (probablement proche du taux de mutation). Quand la "pression du biocide" est relâchée, la fréquence des sensibles augmente. Toutefois, la fitness d'un gène de résistance peut être partiellement ou totalement restaurée par la sélection de nouvelles mutations. Les mutations de restauration sont de nature variée (mutations ponctuelles, duplications) et concernent le gène porteur de la mutation conférant la résistance lui-même ou d'autres gènes. Dans les quelques cas documentés (résistance aux anti-viraux et aux antibiotiques), plus de 30 mutations restaurant la fitness d'un gène de résistance particulier ont pu être identifiées. La probabilité d'apparition de telles mutations semble donc entre 10 et 100 fois plus élevée que celles des mutations induisant la résistance. Ce phénomène de restauration de fitness a des conséquences médicales et agronomiques importantes: quand il s'est produit, diminuer ou même supprimer la pression du biocide n'a plus d'incidence sur la fréquence des sensibles.

En présence d'un biocide, les individus résistants ont une fitness plus élevée que les individus sensibles. Pour de nombreux organismes, nous sommes aujourd'hui dans une situation où des gènes distincts, conférant une résistance à un même biocide, ont été sélectionnés. Les différents génotypes résistants peuvent avoir des fitness différentes et, quand ils coexistent dans une population, leur fréquence changera en relation avec la pression de sélection du biocide. La résistance à un biocide pourra donc changer d'intensité, et son support génétique se modifier profondément au cours des générations.

Evolution de la résistance : les inconnus.

La persistance des espèces depuis que la vie existe sur notre planète, est liée à leur capacité à s'adapter aux changements qui se produisent dans leur environnement. La résistance aux biocides est une expression de cette capacité. Elle repose avant tout sur la variabilité génétique et les mécanismes qui la génèrent: mutations et migration. On a identifié, chez quelques espèces, le ou les gènes impliqués dans la résistance, parfois la ou les mutations. Dans beaucoup de cas, seule la capacité à survivre l'exposition à une concentration supérieure à celle qui était létale auparavant est constatée. On comprend comment la fréquence des phénotypes résistants varie en fonction de la pression de sélection au cours des générations, et ces changements peuvent être modélisés en tenant compte de facteurs spécifiques aux organismes considérés (systèmes de reproduction, distribution spatiale, taux de migration, ... etc).

Ces connaissances sont encore émaillées de « boîtes noires ». Par exemple, quel est le taux de mutation donnant une résistance au niveau d'un gène particulier? Le taux moyen de mutations ponctuelles par génération varie entre 10^{-6} et 10^{-9} selon les auteurs. On sait qu'il n'est pas constant sur l'ensemble du génome d'une espèce, qu'il diffère entre espèces, et qu'il peut se modifier en réponse à la sélection. (Les biocides en eux-mêmes ne sont pas

mutagènes – c'est une caractéristique très contrôlée avant la mise sur le marché. Toutefois, un organisme exposé à un biocide sera plus apte à lui résister si sa capacité à muter augmente : cela donnera à la sélection par le biocide une panoplie plus large de gènes mutés pour trier les plus favorables.) La sélection agit sur un phénotype, lui-même dépendant d'une protéine. La probabilité de substitution d'un acide aminé précis par celui qui induira une résistance n'est pas la même selon le codon, même si le taux de mutation est identique. Des questions comparables se posent avec les mutations donnant lieu à des duplications. Il est probable que la fréquence de ce type de mutation est faible. Toutefois les duplications peuvent engendrer la multiplication du nombre de copies du gène (amplification) par recombinaisons inégales. La fréquence des recombinaisons inégales est de l'ordre de 1% chez certaines espèces. Si le niveau de résistance est plus ou moins proportionnel au nombre de copies de gène contenu dans l'amplification, il augmentera rapidement.

Une autre « boîte noire » est tout ce qui se passe entre le moment où l'on commence à utiliser un biocide et celui où on constate la première résistance, tant au niveau physiologique que des populations.

Enfin, la dynamique de la résistance dans les populations naturelles est peu documentée. Celle des changements de fréquence des gènes de résistance est réduite à quelques cas. C'est pourtant la dynamique des gènes de résistance qui permettra de mieux comprendre l'évolution de la résistance au niveau de chaque espèce, et de préciser l'échelle géographique pertinente pour rendre efficaces les mesures de prévention. La difficulté des études sur la dynamique des gènes de résistance est le décalage qui existe le plus souvent entre la première observation d'une résistance et l'identification du gène responsable. Dans le passé, ce décalage était d'une ou deux décennies. Ce décalage devrait se réduire avec les nouveaux outils moléculaires dont nous disposons. Mais il est important de pouvoir reconstruire la continuité des événements dans le temps et dans l'espace pour comprendre la dynamique des gènes de résistance et identifier les facteurs responsables de cette dynamique.

Les stratégies pour pallier l'impact négatif des phénomènes de résistance

Historiquement, les premières actions pour limiter l'impact négatif de la résistance ont été d'augmenter les doses de biocides utilisées. Puis on a changé la nature du biocide. Puis on a appliqué des stratégies d'utilisation des biocides qui tentaient de stopper ou tout au moins de ralentir le phénomène d'adaptation : combinaison de biocides, rotations, création de refuges non traités, organisation géographique particulière des traitements,... (Notons que toutes ses stratégies reposent implicitement sur le fait que la fitness des phénotypes résistants est plus faible que celles de phénotypes sensibles et/ou que le taux de mutation est très bas.)

Ces trois alternatives sont, semble-t-il, les seules disponibles. Elles sont à considérer dans un contexte socio-économique où (1) nous sommes plus conscients des risques environnementaux liés à la toxicité vis à vis des organismes non ciblés, (2) un coût de mise au point de nouveaux biocides (médicaments ou pesticides) toujours croissant, et (3) une "vie" des nouveaux biocides potentiellement relativement courte.

Dynamique scientifique

La prise de conscience des problèmes médicaux et agronomiques liés au développement de la résistance a commencé il y a une vingtaine d'années, mais ce n'est que depuis les années 1990 que les recherches se sont intensifiées (voir tableau en annexe).

Les réflexions sur les mesures à prendre sont convergentes pour l'ensemble des biocides. On peut en trouver le détail dans deux recueils: *WHO Global Strategy for Containment of Antibicrobial Resistance* (WHO/CDS/DRS/2001.2) pour la résistance aux antimicrobiens et

Pesticide Resistance. Strategies and Tactics for Management publié en 1986 par la National Academic Press (Washington D.C) pour la résistance aux pesticides.

Schématiquement, elles incluent:

- la mise en place de mesures visant, d'une part, à limiter l'utilisation des biocides aux cas où ils sont vraiment nécessaires et, d'autre part, à réduire les risques de sélection de résistance(s);
- la mise en place de systèmes de surveillance de la résistance (et des gènes qui en sont responsables) afin (1) d'évaluer l'efficacité des mesures prises pour la contrôler au niveau local, régional, voire mondial, (2) d'identifier les nouvelles tendances de son évolution, et (3) de développer des techniques de prévision;
- le soutien de recherches visant à développer de nouveaux biocides en combinant les expertises académiques et du monde industriel (firmes pharmaceutiques et chimiques). Il s'agit notamment d'utiliser la connaissance des génomes et des approches multidisciplinaires de la génétique moléculaire et structurale, de la chimie de synthèse, de la modélisation moléculaire, de biologie cellulaire, de la physiologie...

Les perspectives scientifiques et les priorités envisageables

Les deux grands axes de recherche qui se dégagent sont :

- d'une part, améliorer nos connaissances sur les mécanismes et l'évolution dynamique de la résistance. L'objectif est de limiter son impact à court terme (10/20 ans), et surtout à long terme.
- d'autre part, soutenir le développement de nouveaux biocides pour remplacer ceux qui sont ou vont devenir inefficaces dans les prochaines années, ou qui sont jugés trop toxiques pour l'environnement.

Pour les deux axes, les collaborations et coopérations entre disciplines scientifiques sont indispensables. Les contacts entre spécialistes travaillant sur des organismes différents (microorganismes, virus, parasites, cancer, plantes, ...) sont à encourager fortement pour faire émerger des idées nouvelles. La prise en compte des acteurs de différentes origines – académiques, industriels, agences gouvernementales, personnels confrontés avec le terrain (médecins et personnels soignants, agriculteurs) – est un gage de réussite.

Mécanismes et évolution dynamique de la résistance

Il s'agit de faire progresser nos connaissances sur les mécanismes de résistance et l'identification des gènes impliqués en utilisant l'ensemble des outils apportés par le séquençage des génomes, la génétique moléculaires, la protéomique, la biologie cellulaire... De mettre au point les outils d'identification de ces gènes (ou de leurs mutations) dans les populations naturelles, pour pouvoir effectuer le suivi des variations de leur fréquence en relation avec les niveaux de résistance observés. D'utiliser les approches de biologie et génétique des populations, et de l'écologie fonctionnelle et évolutive pour analyser leur dynamique temporelle et spatiale. D'utiliser la modélisation à des fins prédictives. Ces recherches doivent être faites en liaison avec les acteurs chargés de la surveillance de la résistance qui, suite aux recommandations des organismes internationaux, commencent à se mettre en place dans différents pays (USA, Europe,...). Un aspect important serait de mettre en place des méthodes de conservation des échantillons afin de revenir sur leur analyse quand les outils diagnostiques d'identification des gènes de résistance sont au point. On pourrait ainsi reconstituer les scénarios d'évolution afin d'améliorer nos systèmes de prédiction. Ces derniers sont l'enjeu du futur pour les biocides actuellement sur le marché, comme pour ceux qui seront mis au point dans le futur.

Développer de nouveaux biocides

C'est un aspect indispensable à développer, car beaucoup des biocides utilisés actuellement ne pourront plus l'être dans le futur. La perte d'intérêt des industries pharmaceutiques et chimiques dans ce domaine, implique que la recherche académique accepte d'y attribuer un fort investissement. Elle en a les moyens conceptuels et techniques. Elle peut se mobiliser pour utiliser les approches pluridisciplinaires indispensables : la connaissance des génomes, les outils moléculaires et protéomique, la chimie structurale et combinatoire, les outils de biologie cellulaire.

Il faut envisager de soutenir les recherches qui, aujourd'hui, semblent prometteuses mais aussi les idées nouvelles proposant des voies d'investigation encore inexplorées, en acceptant des risques d'échec. Les progrès de la biologie intégrative, de la physiologie sont à suivre avec attention pour imaginer de nouvelles cibles, de nouvelles molécules (constitution d'une cellule de veille ?). Enfin, l'expérience que nous avons de la résistance doit rester présente à l'esprit, et être utilisée pour anticiper les résistances qui très probablement apparaîtront, en tenant compte de la diversité génétique qui existe chez les espèces considérées et des mécanismes qu'elles ont mis en place pour la maintenir (mutations, systèmes de reproduction, éléments mobiles).

Résistance et société

La résistance est un problème de société. Elle concerne les pays du Nord comme ceux du Sud, la santé et l'agriculture au sens large. Sa propagation rapide dans une espèce donnée est en large part le résultat de la globalisation des transports (voyages, commerce), des conditions économiques et politiques locales (guerres, réfugiés, migrants économiques). Elle permet à certaines espèces d'envahir des environnements nouveaux (hôpitaux et maladies nosocomiales, nouvelles cultures et mauvaises herbes, ...).

Limiter la résistance doit donc s'appuyer sur des actions locales, régionales, nationales et internationales, touchant les domaines de l'éducation, de la santé et de l'agriculture.

Documents consultés

- Anonyme, 1986. Pesticide resistance. Strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington DC
- Levy S. B. and Marshal B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10:S122-127.
- Longley D.B. and Johnston P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology* 205: 275-292.
- Maisnier-Patin S. and Andersson D.I., 2004. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Res. Microbiol.* 155 : 360-369
- WHO, 2001. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO/CDS/DRS/2001.2
- Nombreux documents obtenus sur des sites internet : MEDD (France), Center of Disease Control, Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), FAO, etc.

Remerciements

N. Pasteur (Institut des Sciences de l'Evolution, UMR 5554, Université Montpellier 2) remercie Bernard Godelle, Patrick Monfort, Georges Pasteur, Michel Raymond et Henri Vial, pour les documents qu'ils lui ont communiqués et pour leur disponibilité dans des discussions.

Un essai d'évaluation de la dynamique scientifique dans le monde et en France sur les recherches concernant la résistance aux biocides.

Le tableau ci-dessous résume les résultats d'interrogations de la base de données ISI WEB OF SCIENCES (WOS), pour évaluer l'intérêt que la communauté scientifique donne aux phénomènes de résistance à deux types de biocides : les antibactériens (identifiés par le mot clé « microb* ») et les insecticides (mot-clé insect*). La même interrogation a été faite sur l'ensemble de la base (Monde) et pour la France en précisant le pays dans le champ des institutions. Il a été vérifié que les interférences entre « microb* » et « insect* » étaient négligeables.

	Monde / 5 ans	France / 5 ans	% France/ monde
1945-1955	84	0	0%
1955-1960	60	0	0%
1961-1965	105	0	0%
1966-1970	148	0	0%
1971-1975	167	2	1%
1976-1980	262	5	2%
1981-1985	327	5	2%
1986-1990	429	18	4%
1991-1995	4 264	237	6%
1996-2000	6489	487	8%
2001-2005	7642	571	7%

Avec toute la prudence qu'il faut accorder à une telle analyse, on note dans le monde comme en France :

- la forte augmentation du nombre d'articles (environ 10 fois) entre la période 1986-1990 et la période 1991-1995. Ce fait est probablement à relier à la prise de conscience des problèmes de résistance, en particulier au niveau médical dans le monde (voir rapport WHO 2001).
- la persistance de l'augmentation du nombre d'articles depuis la période 1991-1995, avec une participation de la France variant de 6 à 8%.