

« Deep mutational scanning » pour la sélection stratégique de cibles antibiotiques et la conception de médicaments antimicrobien

Liselot Dewachter

“Deep mutational scanning” for the strategic selection of antibiotic targets and the design of antimicrobial drugs

Antibiotics constitute a crucial pillar of modern healthcare, yet their efficacy is severely threatened by the development and spread of antibiotic resistant bacterial pathogens. Unfortunately, the antibiotic development pipeline has not been able to keep up with this increase in resistant bacterial pathogens. On the contrary, there is an increasingly urgent lack of new antibiotics in development. This stagnation is fueled by both scientific and economic barriers that impede the discovery and optimization of novel antimicrobial compounds. Here, we discuss some of these barriers as well as possible solutions that are being pursued. We focus, in more detail, on the added value that deep mutational scanning approaches could bring in funneling scarce resources to the most high-potential antibiotic targets and lead compounds. Considering the complexity of the problem, it is clear that a multipronged approach is needed to mitigate the situation. Such an approach needs to include impactful solutions for both scientific and economic challenges linked to antibiotic development. In addition, responsible usage of available antibiotics and appropriate measures to prevent infections will prove crucial to help bridge the time until new antimicrobial compounds reach the market.

KEYWORDS

Antibiotic resistance, antibiotic development, CRISPR

Les antibiotiques constituent un pilier essentiel des soins de santé modernes, mais leur efficacité est gravement menacée par l'émergence et la propagation de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Malheureusement, le pipeline de développement des antibiotiques n'a pas suivi la croissance du nombre de bactéries pathogènes résistantes. Au contraire, on constate un manque pressant de nouveaux antibiotiques en cours de développement. Cette stagnation est alimentée par des obstacles scientifiques et économiques qui entravent la découverte et l'optimisation de nouveaux composés antimicrobiens. Nous abordons ici certains de ces obstacles ainsi que les solutions possibles actuellement à l'étude. Nous nous intéressons plus particulièrement à la valeur ajoutée que les approches de « deep mutational scanning » pourraient apporter en canalisant les ressources limitées vers les cibles antibiotiques et les composés phares les plus prometteurs. Vu la complexité du problème, il est clair qu'une approche à plusieurs volets est nécessaire pour remédier à cette situation. Elle doit inclure des solutions efficaces pour relever les défis tant scientifiques qu'économiques liés au développement des antibiotiques. En outre, une utilisation responsable des antibiotiques disponibles et des mesures appropriées de prévention des infections sont cruciales pour aider à combler le délai jusqu'à la commercialisation de nouveaux composés antimicrobiens.

What is already known about the topic?

We will soon celebrate the 100th anniversary of the discovery of the first antibiotic, penicillin. In those 100 years, we have learned a lot about both the mode of action of various antibiotics, and – unfortunately – also about the myriad of ways bacterial pathogens can acquire resistance against these compounds. To keep up with resistance development, it is therefore clear that we are involved in a never-ending arms race that requires the continuous development of novel antimicrobial therapies. However, being aware of this fact has not helped us to deliver the necessary results. Not nearly enough potential new antibiotics are currently in the pipeline, thereby tipping the scales in favor of resistant bacterial pathogens.

Que savons-nous à ce propos ?

Nous célébrerons bientôt le centenaire de la découverte du premier antibiotique, la pénicilline. Au cours de ces cent dernières années, nous avons beaucoup appris sur le mode d'action de divers antibiotiques, mais aussi – malheureusement – sur les innombrables façons dont les bactéries pathogènes peuvent développer une résistance à ces composés. Pour faire face au développement de la résistance, il est donc évident que nous sommes engagés dans une course à l'armement sans fin qui nécessite le développement continu de nouvelles thérapies antimicrobiennes. Cependant, le fait d'être conscients de cette réalité ne nous a pas aidés à obtenir les résultats nécessaires. Il n'y a actuellement pas assez de nouveaux antibiotiques potentiels en cours de développement, ce qui fait pencher la balance en faveur des bactéries pathogènes résistantes.

What does this article bring up for us?

The antibiotic resistance problem is extremely complex and many factors have contributed to the current lack of novel antibiotics in development. Discovery of novel antimicrobial compounds has become a difficult and complicated task for which scientific solutions are needed. However, the main challenges impeding innovation are the economic barriers that render the profits associated with antibiotic development low or even non-existent. Although regulatory and/or political changes are needed to fully overcome these financial barriers, some clever scientific solutions, including improved target and lead compound selection, may also boost the profitability of antibiotic development and may help spark pharmaceutical interest in this area.

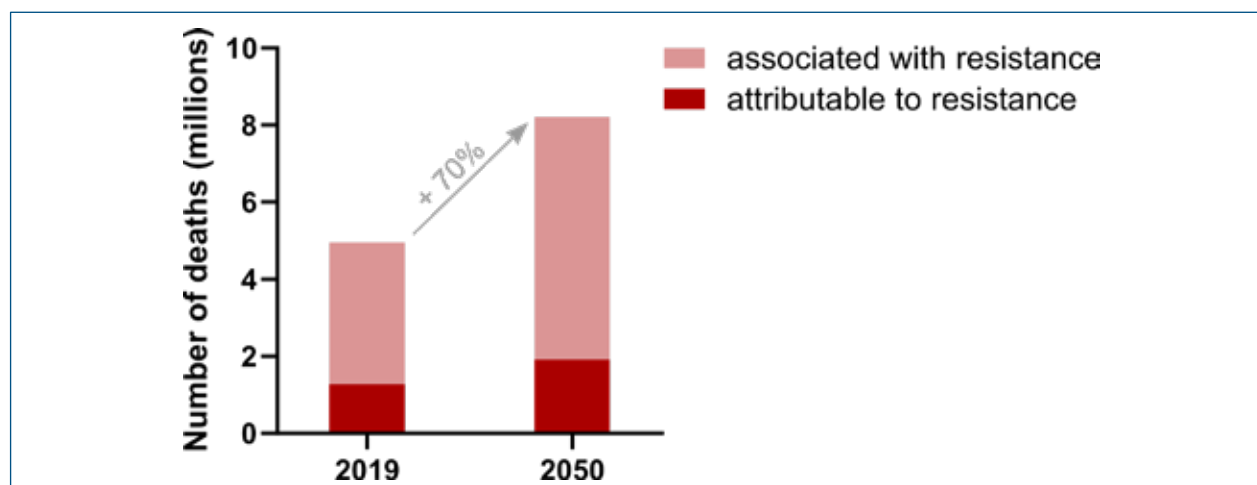
Que nous apporte cet article ?

Le problème de la résistance aux antibiotiques est extrêmement complexe et de nombreux facteurs ont contribué à la pénurie actuelle de nouveaux antibiotiques en cours de développement. La découverte de nouveaux composés antimicrobiens est devenue une tâche difficile et complexe qui nécessite des solutions scientifiques. Cependant, les principaux obstacles à l'innovation sont les barrières économiques qui rendent les bénéfices liés au développement d'antibiotiques faibles, voire inexistantes. Bien que des changements réglementaires et/ou politiques soient nécessaires pour surmonter pleinement ces obstacles financiers, certaines solutions scientifiques ingénieuses, notamment une meilleure sélection des cibles et des composés phares, pourraient également renforcer la rentabilité du développement d'antibiotiques et contribuer à susciter l'intérêt des acteurs du monde pharmaceutique pour ce domaine.

Les antibiotiques constituent un outil essentiel dans les soins de santé modernes. Non seulement ces médicaments sont indispensables pour traiter les infections bactériennes, mais ils représentent également un pilier de la médecine préventive, où les traitements antibiotiques prophylactiques contribuent à réduire les risques liés aux interventions chirurgicales, à la chimiothérapie, etc. Malheureusement, l'efficacité de notre arsenal antibiotique est gravement menacée. La résistance à l'ensemble des antibiotiques actuellement disponibles est très répandue et de nombreux agents pathogènes ont acquis une multirésistance, réduisant ainsi les options thérapeutiques (1–3). Ce problème de résistance aux antibiotiques est devenu une préoccupation sanitaire mondiale urgente. On estime qu'en 2019, 4,95 millions de décès dans le monde étaient associés à la résistance aux antimicrobiens (c'est-à-dire causés par une infection par un agent pathogène résistant), dont 1,27 million de décès résultaient directement de cette résistance et de l'échec du traitement qui s'ensuivait (1) (Figure 1). Les

prévisions pour l'avenir indiquent que les problèmes pourraient s'aggraver. Le nombre de décès dus à la résistance aux antibiotiques devrait augmenter de près de 70% d'ici 2050 (pour atteindre 8,22 millions de décès associés à la résistance et 1,91 million de décès directement attribuables à la résistance) (2) (Figure 1). Bien que cette aggravation prévue soit en grande partie due à une évolution démographique mondiale liée au vieillissement de la population², il est indéniable que l'augmentation et la propagation de la résistance elles-mêmes contribuent fortement à la crise de la résistance aux antibiotiques à laquelle nous sommes confrontés (1–3). Les chiffres alarmants présentés ci-dessus soulignent la gravité de ce problème de santé mondial critique et expliquent pourquoi ce phénomène est parfois qualifié de « pandémie silencieuse ». En effet, malgré sa gravité et son ampleur mondiale, la résistance aux antibiotiques ne fait l'objet que de peu d'attention et les ressources investies dans la mise au point de solutions à ce problème de santé croissant sont largement insuffisantes.

FIGURE 1. BILAN ACTUEL ET PRÉVISIONNEL DES DÉCÈS LIÉS À LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES



Les décès associés à la résistance sont définis comme le nombre de décès supplémentaires par rapport à un scénario sans infection. Les décès attribuables à la résistance correspondent au nombre de décès supplémentaires par rapport à un scénario dans lequel l'infection serait sensible aux médicaments. Données tirées de Murray *et al.*, 2022 (1) et Naghavi *et al.*, 2024 (2), sous licence CC BY 4.0.

Ce manque de ressources spécifiques a entraîné l'assèchement du pipeline de découverte d'antibiotiques. Pour aggraver la situation, la majorité des rares agents antibactériens actuellement encore en cours de développement ne répondent pas aux critères d'innovation fixés par l'Organisation mondiale de la Santé (4,5). On ne peut donc pas s'attendre à ce qu'ils apportent une solution efficace, à grande échelle ou à long terme au problème de la résistance aux antibiotiques. Ce manque de développement d'antibiotiques a de nombreuses causes, avec des obstacles tant scientifiques qu'économiques à surmonter (3–5). Sur le plan scientifique, il est devenu extrêmement difficile de découvrir de nouveaux composés naturels dotés d'une activité antimicrobienne à l'aide de la plateforme classique de Waksman. Malheureusement, cette plateforme – qui identifie les micro-organismes du sol produisant des composés antimicrobiens en fonction de leur capacité à inhiber la croissance bactérienne – a été exploitée jusqu'à épuisement et conduit désormais principalement à la redécouverte d'antimicrobiens connus (3–5). Il est donc nécessaire d'adapter cette stratégie afin de valoriser le potentiel inexploité qui pourrait encore se cacher dans le sol, ou éventuellement au sein d'autres communautés microbiennes qui ont jusqu'à présent échappé à notre attention. Par exemple, cibler des micro-organismes jusqu'alors incultivables pourrait permettre de découvrir de nouveaux antibiotiques (6). De même, des méthodes indépendantes de la culture, telles que l'exploration des génomes, peuvent être utilisées pour identifier des clusters de gènes biosynthétiques susceptibles de produire des composés antimicrobiens, qui peuvent ensuite être clonés et exprimés en laboratoire (7).

D'autres méthodes, telles que le criblage de bibliothèques chimiques et la conception de médicaments basée sur la structure, peuvent également déboucher sur des antimicrobiens innovants, d'autant plus que les progrès en matière d'IA et de « machine learning » devraient permettre d'améliorer les taux de réussite jusqu'ici faibles de ces approches (5,8,9).

Cependant, aucune de ces approches scientifiques ne permet de surmonter les obstacles économiques liés au développement des antibiotiques. Ces barrières économiques constituent pourtant un frein particulièrement important. Elles font que les marges bénéficiaires du développement des antibiotiques sont faibles, voire inexistantes, ce qui a conduit la plupart des grandes entreprises pharmaceutiques à mettre fin à leurs programmes de développement d'antibiotiques (4,5). Les raisons de ce faible retour sur investissement sont multiples (4). Étant donné leur importance et leur utilité générale, les antibiotiques doivent être largement accessibles et sont donc vendus à bas prix. À cela s'ajoute le fait que les antibiotiques ne sont pris que pendant une courte période, ce qui se traduit par de faibles volumes de vente. De plus, ces faibles ventes devraient diminuer avec le temps, car le développement de la résistance entraînera une perte d'efficacité des antibiotiques. Enfin, des programmes de gestion stratégique bien intentionnés restreignent l'utilisation clinique des antibiotiques nouvellement développés afin de les réserver comme option thérapeutique de dernier recours et de ralentir le développement de la résistance. Si cette stratégie est valable et efficace d'un point de vue clinique, la réalité économique est que de telles mesures limitent

encore davantage les ventes de traitements antibiotiques nouvellement développés et découragent ainsi les investissements dans le développement d'antibiotiques (4).

S'il est évident que le modèle économique du développement des antibiotiques doit être repensé pour surmonter ces obstacles financiers, certaines initiatives scientifiques pourraient également contribuer à accroître la rentabilité du développement des traitements antimicrobiens. Une piste envisageable consiste à se concentrer sur les traitements combinés, dans lesquels deux médicaments existants ou plus sont administrés conjointement afin de créer des effets synergiques contre les agents pathogènes bactériens (résistants). Ces traitements combinés présentent des avantages importants par rapport au développement de nouveaux antibiotiques. Tout d'abord, en partant de médicaments (antimicrobiens) existants déjà approuvés pour un usage clinique chez l'homme, cela pourrait non seulement réduire le temps nécessaire pour mettre ces traitements sur le marché, mais aussi diminuer considérablement les coûts liés au développement. De plus, il est généralement beaucoup plus difficile pour les bactéries de développer une résistance à une combinaison de composés, ce qui signifie que ces traitements devraient rester efficaces plus longtemps que ne le seraient des monothérapies (3). Cela permet ainsi de disposer d'une fenêtre temporelle plus longue pour générer des revenus et d'un retour sur investissement potentiel plus élevé. Compte tenu de ces avantages, des expériences à haut débit ont été menées afin d'évaluer l'activité antimicrobienne d'un large éventail de combinaisons médicamenteuses contre des bactéries pathogènes à Gram négatif et à Gram positif (10,11). Ces études, ainsi que d'autres, ont montré que les combinaisons de composés peuvent effectivement cibler de nouvelles vulnérabilités bactériennes et ainsi éliminer efficacement les bactéries pathogènes résistantes (10–12). Cependant, les efforts de criblage à grande échelle ont également montré que les antagonismes sont plus fréquents que les synergies et que ces dernières sont fortement spécifiques à chaque espèce (10,11). Les traitements combinés doivent donc être soigneusement conçus et administrés afin d'obtenir l'activité souhaitée contre l'agent pathogène visé.

Par ailleurs, lors du développement de nouveaux composés antimicrobiens destinés à des (mono)thérapies, une sélection stratégique des cibles antibiotiques ou des composés phares pourrait potentiellement améliorer la rentabilité de l'entreprise. Comme indiqué plus haut, de nombreux facteurs expliquent la réticence de l'industrie pharmaceutique à investir dans le développement d'antibiotiques, mais l'un des principaux tient au fait que les nouveaux antibiotiques finissent par perdre leur efficacité à mesure que les bactéries développent une résistance, ce qui entraîne une baisse des revenus. Toute intervention permettant de concentrer les ressources sur les cibles anti-

biotiques et les composés phares les moins susceptibles de développer une résistance pourrait donc rendre le développement d'antibiotiques plus attractif. Afin de faciliter cette sélection stratégique, nous avons créé et évalué une procédure génétique capable de prédire a priori la facilité avec laquelle une résistance *de novo* peut se développer pour chaque cible et chaque composé phare souhaités (13). Cette procédure utilise le « deep mutational scanning », une approche génétique consistant à introduire en masse un grand nombre de mutations souhaitées afin d'étudier leurs effets phénotypiques. Grâce aux progrès des technologies d'édition génomique CRISPR/Cas, le « deep mutational scanning » peut être réalisé en utilisant CRISPR/Cas à haut débit, en introduisant en parallèle des milliers de mutations ciblées dans des génomes bactériens. Cette prouesse technologique permet à son tour d'étudier en profondeur la relation séquence-fonction des protéines bactériennes.

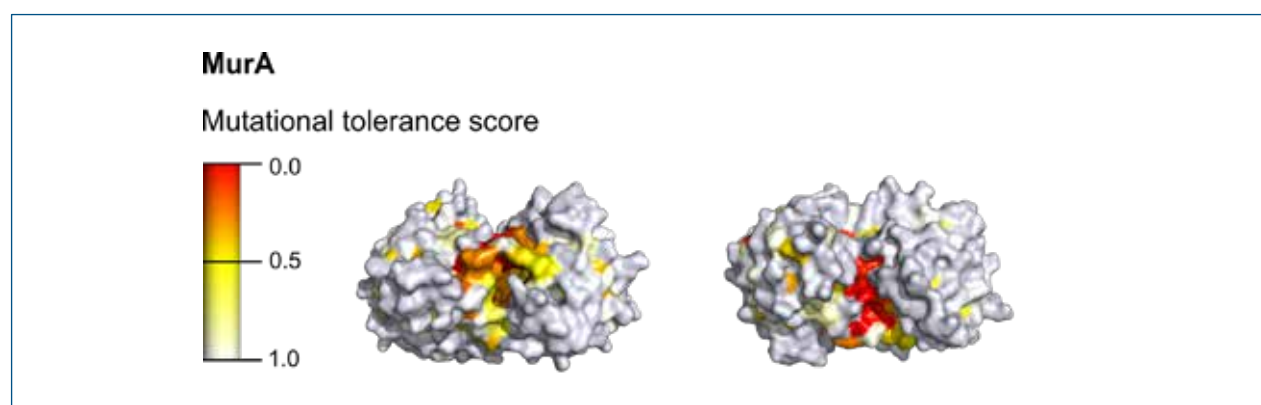
Outre l'intérêt fondamental évident de cette approche de « deep mutational scanning » pour l'étude de la fonction des protéines, elle peut également être exploitée comme une source précieuse d'informations pour le développement de médicaments. À cette fin, nous avons réalisé un « deep mutational scanning » basé sur CRISPR/Cas sur trois cibles potentielles d'antibiotiques de la bactérie *Escherichia coli*, qui sont essentielles à la viabilité en raison de leur rôle crucial dans la synthèse de l'enveloppe cellulaire (FabZ, LpxC et MurA) (13). Plus de 17 000 mutations ont été conçues de manière à ce que, au niveau protéique, chaque acide aminé soit remplacé par tous les autres acides aminés. Après élimination de toutes les mutations qui inactivent la protéine cible et ne sont donc pas viables, ce travail a abouti à une bibliothèque de mutants regroupés codant pour toutes les variantes protéiques fonctionnelles. Une telle bibliothèque de mutants issue d'un « deep mutational scanning » peut s'avérer très utile et efficace pour prédire la probabilité de développement d'une résistance.

Tout d'abord, en cultivant la bibliothèque en présence d'un composé phare, il est possible de sélectionner de manière exhaustive des mutants résistants au cours d'une expérience de culture en une seule étape, puis de les identifier facilement grâce au séquençage du gène cible muté. En effet, la sélection de variants résistants au sein de la bibliothèque permet d'identifier toutes les voies possibles menant à l'acquisition d'une résistance au composé phare en question par le biais d'une modification de la cible. Le nombre de variants résistants et les types de mutations génétiques identifiés peuvent servir d'indicateurs de la facilité de développement de la résistance. Ces informations peuvent à leur tour aider à classer les composés phares en vue d'un développement ultérieur, en fonction de la durée pendant laquelle ils devraient rester efficaces avant l'apparition d'une résistance (13).

Deuxièmement, avant même de développer des composés phares, il est possible d'évaluer le risque de développement d'une résistance chez certaines cibles antibiotiques. Une fois les mutants non viables éliminés, on peut quantifier le nombre de mutations conçues capables de préserver la fonction protéique et, par conséquent, de maintenir la viabilité. De cette manière, on peut évaluer la flexibilité mutationnelle de chaque cible antibiotique potentielle. Moins on détecte de mutants non viables, plus la flexibilité mutationnelle de la protéine est faible et moins il est probable que des mutations résistantes puissent apparaître *de novo* dans cette cible spécifique. En suivant cette stratégie, les protéines cibles moins flexibles sur le plan mutationnel peuvent être identifiées et priorisées pour le développement de médicaments (13).

Enfin, les données issues du « deep mutational scanning » de cibles potentielles pour les antibiotiques pourraient également faciliter la conception de médicaments basée sur la structure. En effet, ces ensembles de données de « deep mutational scanning » indiquent quelles régions protéiques sont essentielles ou importantes pour la fonction et interviennent, par exemple, dans la catalyse, la régulation allostérique ou les interactions protéine-protéine. Ces ensembles de données, en particulier lorsqu'ils sont complétés par des structures protéiques expérimentales ou prédites grâce à l'IA, peuvent faciliter la découverte, la conception et/ou l'optimisation de composés antimicrobiens ciblant la protéine en question avec une puissance prédictive et une résolution sans précédent (13) (Figure 2).

FIGURE 2. STRUCTURE DE LA PROTÉINE MUR A ENRICHIE PAR DES DONNÉES ISSUES D'UNE EXPÉRIENCE « DEEP MUTATIONAL SCANNING », ILLUSTRANT L'IMPORTANCE FONCTIONNELLE ET LA FLEXIBILITÉ MUTATIONNELLE DE CHAQUE RÉSIDU PROTÉIQUE



À partir de ces données, un score de tolérance mutationnelle a été calculé pour chaque résidu protéique en fonction de la facilité avec laquelle ce résidu pouvait être remplacé par d'autres acides aminés. Un score de tolérance mutationnelle élevé signifie que ce résidu pourrait facilement être remplacé par divers autres acides aminés, sans effet négatif sur les capacités de croissance de l'organisme hôte. Les résidus présentant de faibles scores de tolérance, en revanche, sont fonctionnellement importants et ne peuvent pas être facilement substitués. Les régions protéiques présentant de faible score de tolérance constituent des cibles intéressantes pour les petites molécules inhibitrices. Adapté de Dewachter *et al.*, 2023 (13), sous licence CC BY 4.0.

Dans l'ensemble, le « deep mutational scanning » des protéines cibles des antibiotiques peut servir de point de départ riche en informations pour la conception de médicaments basée sur la structure, ainsi que pour estimer le risque de développement d'une résistance chez les protéines cibles et/ou les composés phares. Ainsi, cette approche génétique peut aider à concentrer les ressources sur les cibles et les composés les plus prometteurs et, par conséquent, contribuer potentiellement au développement de médicaments. Bien que puissante, il convient de noter que cette méthode se limite à l'étude des mécanismes de résistance uniquement induits par une modifi-

cation *de novo* de la cible et que des tests supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier d'autres mécanismes de résistance, tels que les limitations dans l'absorption du médicament et l'augmentation de l'efflux.

Malgré ces efforts et d'autres initiatives en cours, il est clair que des mesures supplémentaires efficaces sont nécessaires pour stimuler et encourager le développement de nouveaux antibiotiques. Prenant en compte ces besoins, certaines initiatives tentent actuellement de redéfinir la réalité économique du développement des antibiotiques en garantissant des revenus indépendants des ventes dès la mise sur le marché réussie de nouvelles thérapies (4,5). Toutefois, outre

ces initiatives indispensables, la promotion continue d'une utilisation intelligente et responsable des antibiotiques pourrait également jouer un rôle déterminant. Associées à de bonnes pratiques d'hygiène axées sur la prévention, ces mesures – si elles sont bien mises en œuvre – peuvent contribuer à atténuer la crise de la résistance aux antibiotiques et aider à faire le pont jusqu'à ce que de nouvelles thérapies antimicrobiennes arrivent sur le marché (2).

RECOMMANDATIONS PRATIQUES

- Accordez une attention particulière aux mesures d'hygiène permettant de prévenir les infections. Dans un monde où les traitements perdent de leur efficacité, la prévention est essentielle.

RÉFÉRENCES

1. Murray CJ, Shunji Ikuta K, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399:629–55.
2. Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, Swetschinski LR, Gray AP, Wool EE, *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*. 2024;404:1199–226.
3. Cook MA, Wright GD. The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*. 2022;14(657):7793.
4. Gargate N, Laws M, Rahman KM. Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. *npj Antimicrob Resist*. 2025;3(1):50.
5. Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brønstrup M, Hammann P, Halby L, *et al.* Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*. 2021;5(7):726–49.
6. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*. 2015;517:455–9.
7. Hover BM, Kim S-H, Katz M, Charlop-Powers Z, Owen JG, Ternei MA, *et al.* Culture-independent discovery of the malacins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nat Microbiol*. 2018;3(4):415–22.

Conflits d'intérêts

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêt.

- Utilisez les antibiotiques de manière responsable. Il s'agit d'une ressource très limitée et précieuse, et leur efficacité dépend de la manière dont nous les utilisons.
- Chaque fois que nous le pouvons, sensibilisez nos interlocuteurs à cette question de santé publique et plaidez en faveur d'investissements dans le développement d'antibiotiques.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Pauline Leverrier pour la relecture minutieuse de la version française de ce texte. L.D. est chercheuse associée à la F.R.S.-FNRS.

8. Liu G, Catacutan DB, Rathod K, Swanson K, Jin W, Mohammed JC, *et al.* Deep learning-guided discovery of an antibiotic targeting *Acinetobacter baumannii*. *Nat Chem Biol*. 2023;19:1342–50.
9. Stokes JM, Yang K, Swanson K, Jin W, Cubillos-Ruiz A, Donghia NM, *et al.* A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. *Cell*. 2020;180(4):688–702.e13.
10. Brochado AR, Telzerow A, Bobonis J, Banzhaf M, Mateus A, Selkrig J, *et al.* Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*. 2018;559:259–63.
11. Cacace E, Kim V, Varik V, Knopp M, Tietgen M, Brauer-Nikonow A, *et al.* Systematic analysis of drug combinations against Gram-positive bacteria. *Nat Microbiol*. 2023;8:2196–212.
12. Dewachter L, Dénéréaz J, Liu X, de Bakker V, Costa C, Baldry M, *et al.* Amoxicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* can be resensitized by targeting the mevalonate pathway as indicated by sCRilecs-seq. *eLife*. 2022;11:e75607.
13. Dewachter L, Brooks AN, Noon K, Cialek C, Clark-ElSayed A, Schalck T, *et al.* Deep mutational scanning of essential bacterial proteins can guide antibiotic development. *Nat Commun*. 2023;14(1):241.

CORRESPONDANCE

Pre Liselot Dewachter
UCLouvain, Institut de Duve
Avenue Hippocrate 75
B-1200 Bruxelles
+32 2 436 23 65
liselot.dewachter@uclouvain.be