



**HAL**  
open science

# Hypermutableté et adaptation chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose : rôle des gènes *mutS* et *mutL* et impact sur la résistance aux macrolides

Anne-Laure Prunier

## ► To cite this version:

Anne-Laure Prunier. Hypermutableté et adaptation chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose : rôle des gènes *mutS* et *mutL* et impact sur la résistance aux macrolides. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Caen, 2004. Français. NNT : . tel-00009534

**HAL Id: tel-00009534**

**<https://theses.hal.science/tel-00009534>**

Submitted on 19 Jun 2005

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITE DE CAEN/BASSE-NORMANDIE**

**UFR de Médecine  
Ecole Doctorale Chimie-Biologie Normande  
Caen-Rouen-Le Havre**

**THESE**

présentée par

**Anne-Laure PRUNIER**

et soutenue

**le 16 décembre 2004**

en vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE CAEN  
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Hypermutableté et adaptation chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose : rôle des gènes *mutS* et *mutL* et impact sur la résistance aux macrolides**

**MEMBRES du JURY**

M. Roland LECLERCQ, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie  
M. Erick DENAMUR, Professeur, INSERM E0339, Paris  
M. Thierry LAMBERT, Professeur, Université Paris XI  
M. Yannick AUFRAY, Professeur, Université de Caen Basse-Normandie  
M. Yves LE LOIR, Chargé de Recherche, UMR 1253 INRA-ENSA, Rennes

Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

Je tiens en premier lieu à exprimer toute ma reconnaissance à mon Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Roland Leclercq, qui m'a accueillie dans son laboratoire, confié ce sujet, initiée et guidée sur les chemins de la recherche en me soutenant activement et en me poussant à valoriser mon travail.

Je remercie chaleureusement tous les membres du Jury qui me font l'honneur d'examiner cette thèse :

Monsieur le Pr. Erick Denamur, auquel j'exprime toute mon admiration pour son travail et le grand honneur qu'il me fait d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Pr. Thierry Lambert, ses compétences dans le domaine de la résistance aux antibiotiques rendent précieuse sa qualité de rapporteur de cette thèse.

Monsieur le Pr. Yannick Auffray qui, après m'avoir « mise sur les rails » de la recherche en Maîtrise et en DEA, accepte aujourd'hui de juger mon travail de thèse.

Monsieur Yves Le Loir qui a accepté avec enthousiasme de participer à ce jury.

Je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Caen pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur soutien : Sébastien, Adeline, Marguerite, Michel, Leyla, Camille, Hiep, Zouzou, Julie, Lucie et Dominique, sans oublier les « anciens », Gervais, Bülent et Corinne.

Un grand merci à Olivier Tenaillon, Annie Canu, Brigitte Malbruny et Corinne Villers pour leur relecture attentive et critique de ce mémoire.

J'adresse des remerciements tout particuliers à Claire et Julia pour leur bonne humeur et leur énergie communicatives.

Je remercie le Pr. François Freymuth de m'avoir permis de venir faire quelques manipulations d'ARN au sein de son Laboratoire de Virologie.

Enfin, un grand merci à mes parents et mes amis (rémois et caennais !), qui m'ont toujours encouragée et soutenue.

Je dédie cette thèse à Vincent, qui m'a supportée et épaulée pendant ces trois années...we did it !! ;-)

## ABREVIATIONS UTILISEES

ABT	ABT 773 (céthromycine)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	Acide ribonucléique messenger
ARN <sub>r</sub>	Acide ribonucléique ribosomal
ARN <sub>t</sub>	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
AZI	Azithromycine
CBM	Carbomycine
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLI	Clindamycine
CLR	Clarithromycine
CMI	Concentration minimale inhibitrice
ERY	Erythromycine
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
JOS	Josamycine
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i>
ML	Macrolides, Lincosamides
MLS	Macrolides, Lincosamides, Streptogramines
MLS <sub>B</sub>	Macrolides, Lincosamides, Streptogramines de type B
MS <sub>B</sub>	Macrolides, Streptogramines de type B
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRI	Pristinamycine
Q-D	Quinupristine-Dalfopristine
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
RBS	<i>Ribosome binding site</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction</i>
S <sub>A</sub>	Streptogramine A
S <sub>B</sub>	Streptogramine B
SCV	<i>Small colony variant</i>
SPI	Spiramycine
SRM	Système de réparation des mésappariements
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
TEL	Telithromycine
TYL	Tylosine

# **TABLE DES MATIERES**

**INTRODUCTION.....8**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 13**

**I. Hypermutabilité et adaptation chez les bactéries..... 14**

- A. Introduction ..... 14
- B. Le SRM chez *E. coli* ..... 17
  - 1) Vue générale du SRM ..... 17
  - 2) La protéine MutS..... 19
  - 3) La protéine MutL ..... 22
  - 4) Les autres acteurs du SRM..... 23
- C. Le SRM chez les bactéries à Gram positif ..... 24
  - 1) Le cas particulier des Gram positifs ..... 24
  - 2) *B. subtilis* ..... 26
  - 3) *L. monocytogenes* ..... 28
  - 4) *S. pneumoniae* ..... 28
  - 5) *S. aureus* ..... 30
- D. Rôle du SRM dans l'adaptation des bactéries à leur environnement, cas des bactéries pathogènes..... 30
  - 1) Rôle du SRM dans la pathogénicité ..... 30
  - 2) Rôle du SRM dans la résistance aux antibiotiques ..... 33
  - 3) Rôle du SRM dans la recombinaison ..... 37
- E. Hypermutabilité et mucoviscidose ..... 41
  - 1) Quelques données sur la mucoviscidose ..... 41
    - a) Origine de la maladie ..... 41
    - b) Infections bronchiques associées ..... 41
    - c) Traitements antibiotiques administrés aux malades..... 42
  - 2) Phénotype hypermutable des bactéries isolées chez les malades..... 43

**II. Les macrolides et apparentés (MLS)..... 45**

- A. Structure et classification ..... 45
  - 1) Les macrolides..... 45
    - a) Macrolides à 14 atomes..... 45
    - b) Macrolides à 15 atomes..... 47
    - c) Macrolides à 16 atomes..... 48
  - 2) Une nouvelle classe de macrolides : les kétolides..... 49
  - 3) Les lincosamides ..... 50
  - 4) Les streptogramines..... 51
- B. Activité anti-microbienne des MLS ..... 52
- C. Mode d'action des MLS ..... 53
  - 1) Le ribosome, cible des MLS ..... 53
    - a) Généralités..... 53
    - b) Synthèse protéique ..... 55
    - c) Structures ribosomales impliquées dans la synthèse de la chaîne peptidique..... 57
  - 2) Action des MLS sur le ribosome..... 59
    - a) Fixation..... 59
    - b) Effets sur la synthèse protéique..... 63
- D. La résistance aux MLS ..... 64

1) Mécanismes de résistance décrits chez <i>S. aureus</i> .....	64
a) Efflux actif.....	64
b) Modification enzymatique.....	65
c) Modification de la cible par méthylation de l'ARNr 23S .....	65
2) Mécanismes de résistance par mutation de la cible.....	67
a) Mutations dans l'ARNr 23S .....	67
♦ Domaine V .....	67
♦ Domaine II.....	70
♦ Importance du nombre de copies du gène <i>rrl</i> .....	70
b) Mutations dans les protéines ribosomales.....	71
♦ Protéine ribosomale L4 .....	74
♦ Protéine ribosomale L22 .....	74

## **RESULTATS..... 77**

### **I. Caractérisation des mutations de la cible ribosomale chez des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* résistantes aux macrolides ..... 78**

A. Résumé des résultats présentés dans les articles 1 et 2 ..... 79

Article 1..... 82

#### **Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Didier Tandé, Bertrand Picard et Roland Leclercq.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**, 3054-3056.

Article 2..... 83

#### **Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.**

Anne-Laure Prunier, Hiep Trong Nguyen, Didier Tandé, Christine Segond et Roland Leclercq.

*Microbial Drug Resistance*. Sous presse.

B. Résultats complémentaires : Analyse des gènes de la protéine A (*spa*) et de la super oxyde dismutase (*sodA*) ..... 84

### **II. Mise en évidence d'une forte proportion de souches hypermutables parmi les *S. aureus* isolés de mucoviscidose : rôle des gènes mutateurs..... 86**

A. Résumé des résultats présentés dans l'article 3..... 87

Article 3..... 91

#### **High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportion of hypermutable strains.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Muriel Laurans, Jacques Brouard, Jean-François Duhamel et Roland Leclercq

*Journal of Infectious Disease*, 2003. **187**, 1709-1716.

B. Résultats complémentaires : Analyse des différentes copies du gène <i>rrl</i> portant plusieurs mutations adjacentes .....	92
C. Résumé des résultats présentés dans l'article 4 .....	93
Article 4.....	95
 <b>Analysis of <i>mutS</i> and <i>mutL</i> mutator genes in <i>Staphylococcus aureus</i>.</b>	
Anne-Laure Prunier et Roland Leclercq.	
Soumis pour publication.	
D. Résultats complémentaires .....	96
1) Proportion de souches résistantes à l'érythromycine .....	96
2) Sélection de la résistance par les macrolides et effet sélecteur de la télithromycine.....	96
 <b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	 <b>98</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 <b>104</b>
 <b>ANNEXES .....</b>	 <b>128</b>
Publication supplémentaire .....	129
Liste des publications et communications.....	130
 <b>INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES .....</b>	 <b>132</b>



# **INTRODUCTION**

La notion d'adaptation est à la base de la compréhension du monde vivant. Lamarck puis Darwin furent les premiers à entrevoir que celle-ci ne correspondait pas, comme on l'avait cru jusque là, à un état d'origine divin, mais qu'elle correspondait en fait à un processus dépourvu de toute conscience. Avec Mendel et l'avènement des théories génétiques, le paradigme Néo-darwinien vit le jour, définissant l'adaptation comme un processus mécanique, résultats de deux phénomènes indépendants : 1) les mutations interviennent indépendamment des besoins biologiques, « par erreur » ou par (mal)chance, et 2) la sélection naturelle n'intervient qu'*a posteriori*, retenant uniquement les êtres les plus performants (les meilleurs reproducteurs). Les bactéries ont été intégrées dans ce paradigme grâce à l'expérience de Luria et Delbrück dite du « test de fluctuation », portant sur l'apparition de bactéries résistantes aux phages et montrant que l'acquisition de la mutation précédait la sélection pour le phénotype mutant (Luria et Delbrück, 1943). Cependant, la notion d'indépendance entre l'apparition de mutations et la sélection imposée fut remise en cause en 1988. Cette année-là, Cairns rapporta dans un article publié dans *Nature* que des mutations de réversion des souches Lac- (incapables de métaboliser le lactose) se produisaient bien plus fréquemment quand elles étaient sélectionnées sur un milieu contenant du lactose comme unique source de carbone, et donc que ces mutations étaient utiles pour l'adaptation, que lors de la croissance normale des cellules (Cairns *et al.*, 1988 ; Hall, 1990). Ces mutations adaptatives différaient des mutations de résistance aux phages décrites par Luria et Delbrück par le fait que leur sélection n'est pas létale : les cellules non mutées pouvaient donc survivre et subir des modifications de leur ADN sous la pression de sélection. Par la suite, les néo-darwiniens remirent en cause ces résultats en critiquant la méthodologie employée (Partridge et Morgan, 1988 ; Charlesworth *et al.*, 1988 ; Lenski *et al.*, 1989) et l'auteur lui-même revint sur ses conclusions (Foster et Cairns, 1992). Ce travail avait cependant bousculé le dogme et incité d'autres scientifiques à remettre en causes les bases de la théorie néo-darwinienne. Ainsi, il est désormais communément admis que l'environnement influe sur le taux de mutation au sein d'une population, même si ce n'est pas forcément d'une manière directe. On sait aussi maintenant que de nombreux mécanismes générant des mutations au cours de la réplication ou empêchant la réparation de l'ADN contribuent à la variation génétique. Cependant, le débat reste vif pour déterminer si ces systèmes ont évolué afin de permettre d'augmenter le taux de mutation, ou si cette contribution est involontaire, correspondant tout simplement à un effet secondaire de leur fonction originelle.

Notre propos se limitera ici à l'étude d'une partie de la machinerie cellulaire impliquée dans ces phénomènes. En effet, si l'hypermutableté et l'adaptation sont connues et observées depuis le début des années 60 (Treffers *et al.*, 1954 ; Jyssum, 1960 ; Miyake, 1960), ce n'est que récemment que les progrès techniques, aussi bien dans le domaine de la biologie moléculaire qu'en reconstitution par cristallographie aux rayons X ont permis de commencer à en comprendre les mécanismes sous-jacents.

Pour sa survie dans l'environnement, une bactérie doit conserver et transmettre à sa descendance son patrimoine génétique, même au détriment de l'adaptation de la population. Elle possède pour cela des outils moléculaires dédiés à la réplication et surtout à la réparation de l'ADN. Ces outils lui permettent de maintenir son taux de mutation à un niveau bas et stable. Cette nécessaire stabilité est cependant contre-balançée par la nécessité de s'adapter à toute variation défavorable de l'environnement. Une petite proportion de bactéries capables de modifier leur génome est donc indispensable au sein d'une population. Ce problème est critique dans le cas des bactéries pathogènes qui sont sans cesse soumises à des pressions fortes au sein de l'hôte, que soit du fait de ses propres défenses immunitaires ou des traitements antibiotiques qui lui sont administrés.

Deux mécanismes principaux sont impliqués dans les modifications du génome : l'acquisition de matériel génétique étranger (transfert horizontal) et l'apparition de mutations au cours de la réplication, qui seront transmises à la descendance (transfert vertical). Ces deux mécanismes sont impliqués dans la virulence et la résistance aux antibiotiques des bactéries responsables de pathologies, et ils sont tous deux en partie sous la dépendance du Système de Réparation des Mésappariement (SRM). Les protéines clés de ce système sont celles qui ont pour fonction de reconnaître les mésappariements : MutS et MutL (Modrich et Lahue, 1996). Des défauts peuvent survenir également au sein même des gènes qui codent pour ces protéines, provoquant l'augmentation du taux de mutation et facilitant la recombinaison entre séquences d'ADN non parfaitement homologues. Ces effets ne se limitent d'ailleurs pas au règne procaryote, puisque des altérations des gènes de réparation de l'ADN ont été mis en cause dans la prédisposition à certains cancers chez l'homme (Radman *et al.*, 1995). Cependant, les études concernant les bactéries réalisées jusqu'à présent portent surtout sur le modèle *Escherichia coli*, et les quelques travaux réalisés chez les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis* ont mis à jour des différences importantes dans le fonctionnement du SRM chez les deux espèces.

Notre intérêt pour les phénomènes d'hypermutableté chez *Staphylococcus aureus*, qui n'ont été que très peu étudiés jusque là, est né d'une observation clinique alarmante. Parmi les staphylocoques dorés isolés chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au CHU de Caen, une proportion de plus en plus importante était résistante aux antibiotiques de la famille des macrolides. Or, il se trouve que l'utilisation de ce type d'antibiotiques dans le traitement des surinfections bronchiques associées à cette maladie est croissante, du fait de leur effet bénéfique sur la limitation des processus d'inflammation et d'adhésion des *Pseudomonas aeruginosa* aux poumons des malades. Dans la première partie de ce travail, nous avons donc recherché les mécanismes responsables de cette résistance, et nous avons mis en évidence des mutations dans les structures cibles de ces antibiotiques, l'ARNr 23S et les protéines ribosomales. Ces résultats constituaient déjà une surprise puisque c'était la première fois que de telles mutations étaient détectées chez cette espèce, qui doit plutôt traditionnellement ce genre de résistance à l'acquisition de gènes. Ceci nous suggérait que les souches isolées avaient une facilité à développer des résistances par mutation. Dans la seconde partie du travail, nous nous sommes donc intéressés au phénomène d'hypermutableté, d'autant qu'une publication récente avait décelé une forte proportion de souches hypermutables parmi les *P. aeruginosa* colonisant les poumons des patients atteints de la même maladie (Oliver *et al.*, 2000). En comparant un panel de souches isolées de mucoviscidose avec un panel de souches témoins, nous avons pu montrer que la proportion de souches présentant un taux de mutation anormalement élevé était significativement plus importante dans le premier que dans le second. La recherche des bases moléculaires de ce caractère hypermutable a été réalisée sur les souches concernées en analysant leurs gènes *mutS* et *mutL*. Nous avons pu établir une relation de cause à effet entre l'altération de ces gènes et le phénotype hypermutable pour quatre souches. Enfin, nous avons mis au point un modèle pour l'étude de l'effet de ces gènes sur la recombinaison chez *S. aureus*, qui semble montrer que tous deux n'ont qu'un effet limité sur le phénomène chez cette espèce.

L'étude bibliographique qui illustre nos propos est composée de deux parties. Dans la première partie, nous abordons les notions d'hypermutableté et d'adaptation. Après avoir défini les bases de ces notions, nous détaillons l'état actuel des connaissances concernant le fonctionnement du SRM d'*E. coli* et des bactéries à Gram positif. Par la suite, nous développons le concept d'adaptation des bactéries hypermutables, particulièrement dans le cas des bactéries pathogènes. Enfin, nous présentons la relation récemment mise en lumière entre la mucoviscidose et l'hypermutableté des bactéries colonisant les poumons des patients

atteints de cette maladie. Dans la seconde partie, nous nous attachons à décrire la famille des antibiotiques macrolides et apparentés en présentant leurs structures et leur classification, leur spectre d'activité et leur mode d'action. Enfin, les mécanismes de résistance à ces antibiotiques seront détaillés, aussi bien ceux qui ont déjà été décrits chez le staphylocoque (résistance par acquisition de gènes) que ceux qui concernent des mutations de la cible ribosomale des macrolides.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. HYPERMUTABILITE ET ADAPTATION CHEZ LES BACTERIES

## A. Introduction

Une bactérie hypermutable présente un taux de mutation élevé, pouvant aller de 10 à 1000 fois, par rapport à la population dont elle est issue. On pensait autrefois que, la plupart des mutations étant délétères ou létales, le taux de mutation des organismes vivants avait évolué pour arriver à un niveau minimal (Kimura, 1968), évitant ainsi la multiplication d'altérations au sein du génome tout en générant tout de même une variabilité minimale nécessaire à l'évolution des espèces. Cette proposition a été confirmée au fil du temps par la découverte de nombreux systèmes permettant de contrôler l'intégrité du génome et sa transmission stable au cours des générations. Le Système de Réparation des Mésappariements (SRM) est un de ces systèmes. Il intervient aussi bien en autorisant une réplication fidèle de l'ADN qu'en empêchant la recombinaison entre séquences trop divergentes, ou encore en réparant les altérations chimiques ou environnementales subies par la molécule d'ADN (Miller, 1996). Cependant, tous ces systèmes peuvent eux-mêmes subir des altérations au sein des gènes codant pour les enzymes qui les constituent, ayant pour conséquence une augmentation du taux de mutation au sein de l'organisme, qui devient alors hypermutable (Miller, 1996 ; Horst *et al.*, 1999).

L'adaptation peut être définie comme la correspondance entre une capacité particulière acquise par un organisme et son environnement. C'est le produit de la sélection naturelle (Lenski, 1992). Pendant longtemps, l'évolution adaptative a été vue comme le résultat d'un tri post-mutationnel par le processus de sélection naturelle. On a considéré que les mutations survenaient au hasard, produisant des individus génétiquement différents les uns des autres qui entraient en compétition pour les ressources du milieu, ce qui se concluait par la sélection des génotypes les plus adaptés. Pourtant, la biologie moléculaire a montré au cours des 50 dernières années que le taux et la cible des mutations étaient pour une large part sous le contrôle de facteurs génétiques. Puisque ces facteurs sont eux-mêmes sujets à une évolution adaptative, cette découverte a soulevé le problème de la nature dirigée ou non de la mutagenèse. Il serait en effet très avantageux pour les organismes vivants dans des environnements fluctuants de pouvoir moduler leur dynamique mutationnelle en produisant de façon opportune les mutations adaptatives nécessaires, tout en évitant la génération de mutations délétères (Metzgar et Wills,

2000). Un taux de mutation « optimal » pour une population bactérienne serait donc assez haut pour permettre la variation nécessaire à la survie sur le long terme, et assez bas pour éviter une contre-sélection par des mutations délétères (de Visser, 2002). Une petite proportion de cellules mutatrices dans une population pourrait agir comme un réservoir permettant la sélection du variant le mieux adapté en cas de stress. Ces cellules sont en effet capables d'accumuler rapidement les mutations nécessaires à la sélection.

La notion de « sélection de second ordre » est née de la refonte des théories néodarwiniennes de l'adaptation. Plus qu'une simple sélection pour le variant le plus adapté à un environnement spécifique, cette sélection de second ordre agit sur la régulation du processus d'adaptation génétique à tout nouvel environnement. La survie des populations bactériennes dans un environnement fluctuant dépend de sa capacité à s'adapter, or la probabilité de générer des mutants adaptatifs dépend finalement de la capacité à produire de la diversité génétique. Par conséquent, en sélectionnant les mutants les mieux adaptés, le processus évolutif sélectionne indirectement le système générant ces mutants. C'est donc une sélection de second ordre qui régule le processus mutationnel, provoquant au moins temporairement une augmentation de la proportion de bactéries présentant un taux de mutation élevé dans la population (Tenaillon *et al.*, 2001 ; Giraud *et al.*, 2001b). Au cours de ce processus, les mutateurs sont fixés dans la population par un effet de « hitchhiking » (auto-stop) avec les mutations favorables qu'ils ont générées (Taddei *et al.*, 1997b). En effet, le caractère avantageux ou non de l'augmentation de la fréquence de mutation dépend de plusieurs facteurs, dont la stabilité de l'environnement. Dans des conditions d'environnement stable, les mutateurs sont généralement désavantagés puisqu'ils génèrent des mutations délétères avec une fréquence plus élevée que les non mutateurs (Taddei *et al.*, 1997b). Par contre, dans un environnement fluctuant, les mutateurs seront sélectionnés pour leur capacité à générer des mutations adaptatives (Giraud *et al.*, 2001a). Par conséquent, les mutateurs sont sélectionnés du fait de leur liaison génétique avec les mutations adaptatives qu'ils génèrent plutôt que du fait d'une action directe de leur taux de mutation élevé (Taddei *et al.*, 1997b).

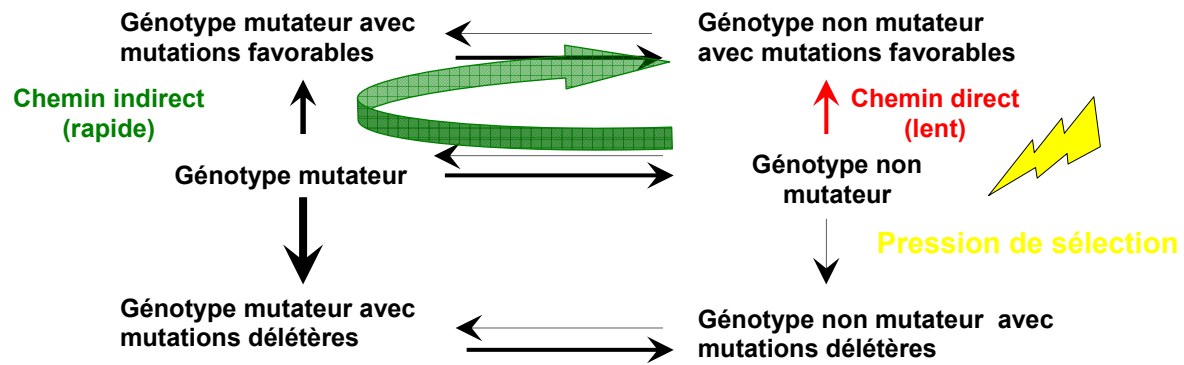
Lors de modélisations mathématiques, confirmées par des expériences de laboratoire, il apparaît que le taux de mutation global d'une population est augmenté pendant la phase d'adaptation (dans des conditions d'environnement défavorables) et qu'il diminue une fois l'adaptation effectuée (Sniegowski *et al.*, 1997 ; Mao *et al.*, 1997 ; Taddei *et al.*, 1997b ; Tenaillon *et al.*, 1999). La fixation des éléments mutateurs dépend de plusieurs paramètres, définis par des modèles développés *in silico* (Tenaillon *et al.*, 1999). Tout d'abord, la taille de



la population : plus importante elle est, plus grande est la probabilité de fixer les mutateurs. Puis la pression de sélection : plus elle est forte et de durée prolongée, plus les mutateurs se fixent. Enfin, le nombre de mutations nécessaires à l'adaptation est également un facteur déterminant : le mutateur possède un avantage d'autant plus important que le nombre de mutations à générer est grand.

Une fois la population adaptée, le phénotype mutateur perd de son intérêt puisqu'il est responsable d'une accumulation importante de mutations délétères ou neutres (Funchain *et al.*, 2000 ; de Visser, 2002). C'est ici que la notion de « mutateur transitoire » intervient : la population la plus performante sera celle qui aura acquis au plus tôt la mutation adaptative par son phénotype mutateur et qui sera ensuite capable de retrouver un taux de mutation faible. Cette réacquisition du phénotype sauvage serait facilitée par la capacité des mutateurs à échanger leur matériel génétique avec d'autres bactéries (Tenaillon *et al.*, 1999 ; Denamur *et al.*, 2000 ; Tenaillon *et al.*, 2000). Dans le cas du SRM, l'état d'hyper-recombinaison serait donc aussi un moteur pour cette réacquisition. En effet, il a été montré chez *E. coli* par des études phylogénétiques que les gènes *mutS* et *mutL* présentaient une structure en mosaïque caractéristique de phénomènes de perte-réacquisition successifs (Eisen et Hanawalt, 1999 ; Denamur *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2001). Ces observations sont appuyées par une étude sur un grand nombre de souches isolées *in vivo*, commensales et pathogènes, et qui a mis en évidence la présence de mutateurs dans toutes les niches écologiques étudiées : il semblerait qu'il existe des phénomènes de transition entre les états mutateur et non mutateur dans toutes les populations (Denamur *et al.*, 2002).

Il existe donc finalement deux voies pour qu'une population de bactéries non mutatrices génère une mutation adaptative, comme schématisé sur la **figure 1**. La première possibilité correspond à la « voie lente » : l'acquisition de la mutation se fait en fonction du taux global de mutation de la population (en général faible). La seconde correspond à une « voie rapide », correspondant à la possibilité d'obtenir une mutation à un taux élevé en passant par un état d'hypermutable transitoire, la restauration du phénotype sauvage étant facilitée par la capacité des mutateurs à recombiner plus facilement leur matériel génétique avec de l'ADN étranger (Taddei *et al.*, 1997b). Le « paradoxe mutateur » décrit donc le fait que l'état d'hypermutable est en général délétère pour la bactérie en tant qu'individu, mais avantageux pour la population, lui conférant une sorte de réserve adaptable rapidement en cas de changement brutal de l'environnement (Radman *et al.*, 2000 ; Giraud *et al.*, 2001b).



**Figure 1.** Les différentes voies permettant aux bactéries d’acquérir des mutations adaptatives. D’après Taddei *et al.* (1997b). Une population de bactéries sauvages soumise à une pression de sélection peut développer la mutation adaptative nécessaire à sa survie selon une voie directe mais lente qui est fonction de son taux de mutation propre, ou selon une voie rapide indirecte passant par un état hypermutateur transitoire, dont le retour à l’état sauvage est favorisé par sa capacité accrue à échanger du matériel génétique. L’épaisseur des flèches correspond à la probabilité de survenue du phénomène schématisé.

D’autres mécanismes que le SRM ont été impliqués dans l’hypermutabilité et l’adaptation bactériennes et sont en relation avec les problèmes de pathogénicité. Par exemple, on sait que le système SOS, activé chez *E. coli* lors de l’accumulation de mutations pour permettre malgré tout la réplication du génome et la génération de descendants, est impliqué dans la dissémination des supports plasmidiques des gènes de résistance parmi les bactéries pathogènes (Beaber *et al.*, 2004). Cependant, notre travail ayant porté sur l’étude des deux gènes clé du SRM, *mutS* et *mutL*, chez l’espèce *S. aureus*, la suite de cette étude bibliographique s’attachera surtout à décrire ce système et les implications de ses altérations dans l’évolution et l’adaptation des populations bactériennes, avec une attention particulière accordée aux bactéries pathogènes.

## B. Le SRM chez *E. coli*

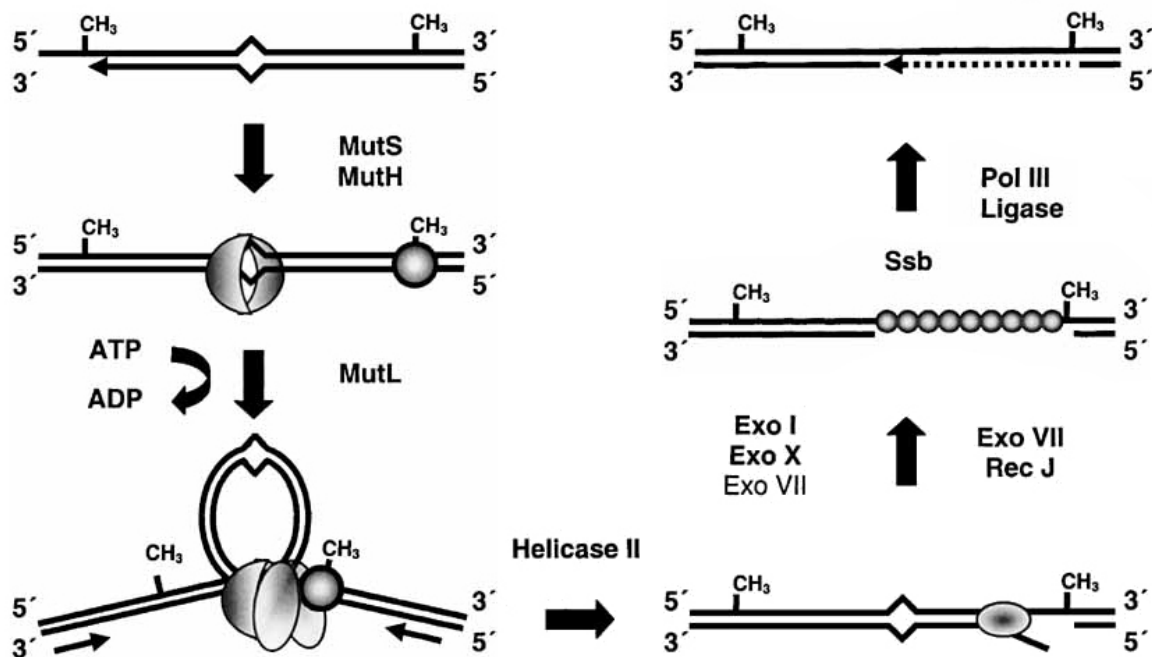
### 1) Vue générale du SRM

La duplication fidèle de l’ADN est essentielle pour la viabilité et la croissance normale d’une bactérie. Cependant, la réplication est un phénomène fréquent et complexe qui peut générer des erreurs, conduisant parfois au mauvais appariement des nucléotides. Si ces erreurs ne sont pas corrigées, on observe une accumulation de mutations nocives, d’où la nécessité

absolue pour les cellules de disposer de protéines de réparation comme celles qui constituent le SRM.

D'autre part, le mésappariement de bases au sein de la molécule d'ADN est également possible au moment de la recombinaison entre séquences d'ADN non parfaitement identiques. Là aussi le SRM intervient, soit en réparant les mésappariements dus à une homologie imparfaite entre les deux fragments (Modrich et Lahue, 1996), soit en empêchant la recombinaison entre deux fragments trop dissemblables (Rayssiguier *et al.*, 1989) (chapitre D.3., page 37)

Quatre gènes sont nécessaires pour un fonctionnement normal de ce système : *mutS*, *mutL*, *mutH*, et *uvrD* (également appelé *mutU*) (Horst *et al.*, 1999). La **figure 2** résume le fonctionnement de l'ensemble.



**Figure 2.** Le Système de Réparation des Mésappariements (SRM) chez *E. coli*. D'après Marti *et al.* (2002).

Le schéma présente un brin d'ADN en cours de répllication avec l'apparition d'une erreur. Le SRM fait d'abord intervenir les protéines MutS, qui se fixe au niveau du mésappariement, et MutH, qui se fixe au niveau d'un site hémiméthylé à proximité du mésappariement. En présence d'ATP, la protéine MutL est recrutée et permet la formation d'un

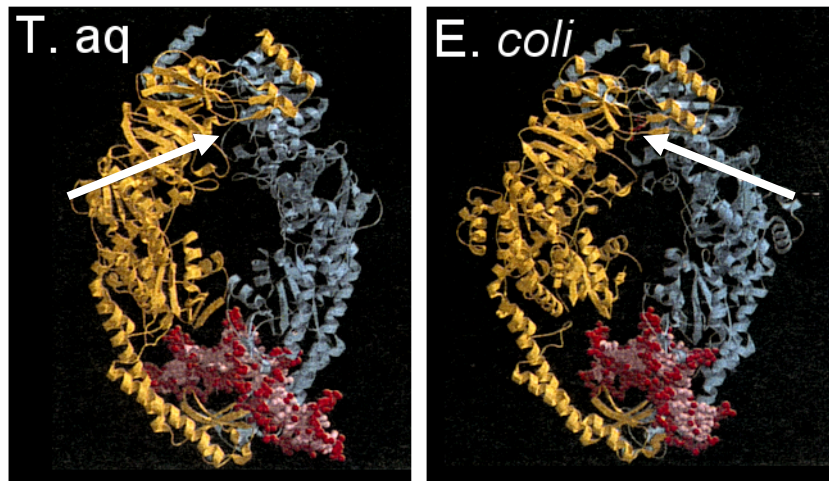
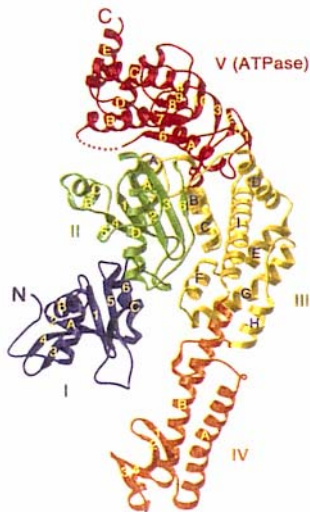
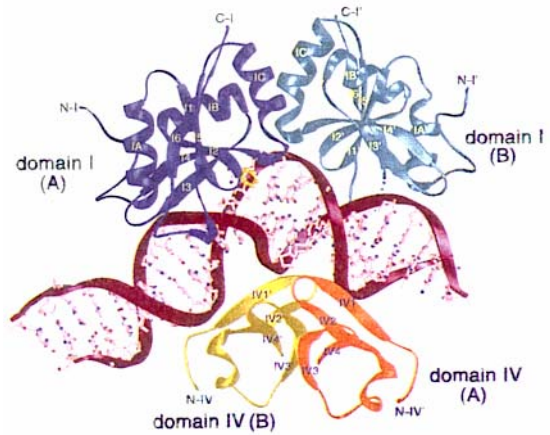
complexe dans lequel MutH est activé et provoque la coupure du brin néosynthétisé non encore méthylé. Les étapes suivantes font intervenir le déroulement de l'ADN par l'hélicase II (MutU ou UvrD) à partir du site de coupure, suivi de la dégradation du brin par des exonucléases, de la resynthèse d'un nouveau brin par l'ADN polymérase III et de la soudure de l'ensemble par la ligase. Ce système reconnaît spécifiquement tous les mésappariements ponctuels, sauf le C/C (Su et Modrich, 1986), ainsi que les insertions ou délétions allant jusqu'à 4 bases (Parker et Marinus, 1992).

L'inactivation de n'importe lequel des 4 gènes du SRM augmente les taux de mutation ponctuelle de 100 à 1000 fois par rapport à une bactérie sauvage (Cox, 1976). Le système nécessite la présence chez la bactérie d'une méthylase Dam qui agit au niveau des séquences GATC en provoquant le branchement d'un groupement méthyle sur le résidu adénine, ce qui permet ensuite aux différents acteurs du SRM de distinguer le brin d'ADN néosynthétisé (portant l'erreur) du brin matrice (Claverys et Lacks, 1986).

La présence d'ATP est indispensable au bon fonctionnement du système. Son rôle précis reste cependant controversé et plusieurs modèles sont encore débattus pour expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents à la réparation des mésappariements par le SRM (Marti *et al.*, 2002 ; Lamers *et al.*, 2004). Quoiqu'il en soit, le fait est que MutS et MutL possèdent toutes les deux une activité ATPase qui est nécessaire pour un bon déroulement des opérations de réparation (Ban *et al.*, 1999 ; Junop *et al.*, 2001).

## 2) La protéine MutS

C'est la base du système, puisque c'est elle qui reconnaît le mésappariement et initie le processus de réparation. Cette reconnaissance n'est pas spécifique d'une séquence particulière mais l'efficacité de la réparation peut être influencée par le contexte dans lequel le mésappariement se trouve (Jones *et al.*, 1987 ; Joshi et Rao, 2001). Chez les procaryotes, la protéine MutS s'assemble en un homodimère qui forme une « pince » autour du double brin d'ADN, dont la structure a été récemment déterminée dans différentes situations pour *E. coli* et *Thermus aquaticus* par cristallographie aux rayons X (Lamers *et al.*, 2000 ; Obmolova *et al.*, 2000 ; Junop *et al.*, 2001). Les deux structures sont remarquablement similaires (**Figure 3A**) et ressemblent à un 8 dont le canal inférieur sert de site de fixation à l'ADN, tandis que la zone de liaison à l'ATP/ADP et de dimérisation se situe à l'autre extrémité (Biswas *et al.*, 2001). Chaque monomère est constitué de 5 domaines distincts représentés dans la **figure 3B**. Les domaines I (acides aminés 1 à 118) et IV (acides aminés 406 à 513) forment le site de

**A****B****C**

**Figure 3.** Structure de la protéine MutS liée à un ADN hétéroduplexe. D'après Hsieh (2001). **A.** Reconstitution par cristallographie aux rayons X du complexe MutS-ADN chez *T. aquaticus* (*T. aq*) et *E. coli*. La sous-unité A est en bleu, la sous-unité B en jaune. L'ADN portant le mésappariement est en rouge (chaîne de phosphates) et rose (bases associées). Le site de fixation de l'ATP/ADP est indiqué par une flèche. **B.** Domaines constituant la protéine MutS de *T. aquaticus* (sous-unité A). Les cinq domaines sont en violet, vert, jaune, orange et rouge entre les extrémités N- et C-terminales. Les hélices  $\alpha$  et les feuilletts  $\beta$  sont indiqués dans l'ordre alphabétique ou numérique, respectivement. **C.** Domaines de l'homodimère de MutS interagissant avec un mésappariement. Les domaines I et IV de la sous-unité A sont respectivement en violet et orange, et ceux de la sous-unité B en bleu et jaune.

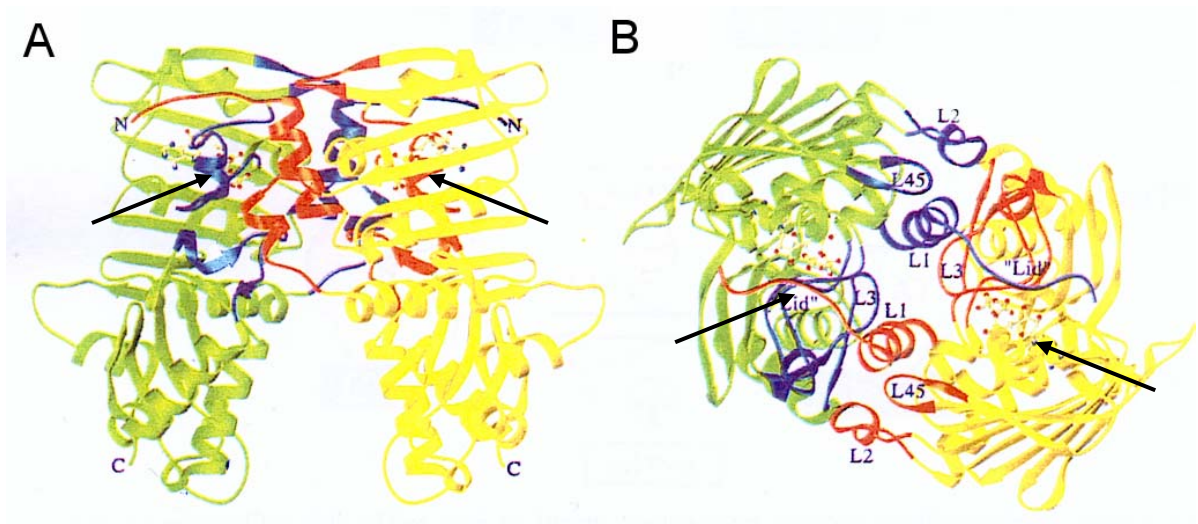
fixation du mésappariement, le domaine I étant en contact direct avec l'ADN et le domaine IV formant les mâchoires de la pince qui maintient l'ensemble. Le site de fixation à l'ATP ainsi que la zone d'interaction primaire entre les deux sous-unités sont situés dans le domaine V (acides aminés 543 à 800), qui constitue en réalité deux domaines fonctionnels : l'ATPase (acides aminés 568 à 755), qui contient deux motifs de Walker A (pour la fixation de l'ATP proprement dite) et B (pour la fixation du cofacteur  $Mg^{2+}$ ) classiques, et le motif HTH de dimérisation (Hélice-Tour-Hélice, acides aminés 766 à 800). Le domaine III (acides aminés 247 à 385 et 514 à 540) constitue un pont structurel entre la région ATPase et le site de fixation à l'ADN, en communiquant directement avec les domaines V et IV et indirectement avec le domaine I *via* le domaine II (acides aminés 132 à 245) (Lamers *et al.*, 2000 ; Obmolova *et al.*, 2000 ; Hsieh, 2001).

La reconstitution par cristallographie a permis de constater que la fixation de l'homodimère de MutS à l'ADN est asymétrique. En effet, seuls les résidus du domaine I de la sous-unité A interagissent directement avec le mésappariement (**Figure 3C**). Par contre, quelle que soit la nature de celui-ci, le mode de reconnaissance par MutS reste le même. Deux résidus d'acides aminés sont particulièrement impliqués dans ce processus : la phénylalanine en position 36 et le glutamate en position 38. De plus, la fixation de MutS provoque invariablement une courbure de  $60^\circ$  dans l'ADN au niveau du mésappariement (Schofield *et al.*, 2001 ; Natrajan *et al.*, 2003). La fixation à un mésappariement provoque en fait un changement conformationnel à la fois de l'ADN et de MutS (Lamers *et al.*, 2000 ; Obmolova *et al.*, 2000). Cela expliquerait comment MutS se lie spécifiquement aux mésappariements, alors que l'affinité pour ceux-ci par rapport à l'ADN normal n'est que 20 fois supérieure, et qu'on estime qu'un mésappariement est quand même un phénomène assez rare ( $1/10^6$  à  $10^7$  paires de bases). Si ce changement de conformation est à l'origine de l'interaction de MutS avec les autres protéines du système, cela expliquerait la spécificité de MutS pour les bases mal appariées (Marsischky et Kolodner, 1999).

Le fonctionnement coordonné de MutS avec les autres acteurs du système reste encore controversé. Certains modèles suggèrent que MutS reste fixée au mésappariement pendant que le complexe MutL-MutS active MutH pour la coupure du brin néosynthétisé (Lamers *et al.*, 2000 ; Obmolova *et al.*, 2000 ; Junop *et al.*, 2001), d'autres suggèrent que MutS quitte le site après une fixation initiale (Allen *et al.*, 1997). Dans ce dernier modèle, MutS provoque, grâce à l'hydrolyse d'ATP, la formation d'une boucle d'ADN avec le mésappariement au sommet, comme le montre le schéma de la **figure 2**.

### 3) La protéine MutL

La partie C-terminale de cette protéine, très peu conservée entre les espèces, est impliquée dans la dimérisation des deux sous-unités qui forment une protéine MutL fonctionnelle et dans l'interaction avec l'hélicase II, UvrD (Hall *et al.*, 1998 ; Yang, 2000). La partie N-terminale est extrêmement conservée sur les 350 premiers résidus et elle peut être séparée de la région variable par l'action de la thrombine, qui donne un fragment de 40 kDa (LN40, acides aminés 1 à 349) et un autre de 30 kDa (LC30, acides aminés 350 à 615). La structure de LN40 liée à un analogue non hydrolysable de l'ATP (ADPnP) a été déterminée par cristallographie aux rayons X pour *E. coli* (Ban et Yang, 1998a ; Ban *et al.*, 1999) (**Figure 4**).



**Figure 4.** Structure de LN40 liée à l'ADPnP (analogue non hydrolysable de l'ATP). D'après Yang (2000). Vues orthogonales du dimère LN40-ADPnP. Une sous-unité est en vert et bleu, l'autre en jaune et rouge. Les parties bleues et rouges correspondent aux structures secondaires formées lors de la liaison à l'ADPnP (L1, L2, L3, L45 et « Lid »). Toutes sont impliquées dans la dimérisation et trois d'entre elles (L1, « Lid » et L3) participent également à la fixation de l'ADPnP, représenté par des structures moléculaires en trois dimensions indiquées par les flèches noires.

En plus de cette analyse structurale, une analyse de séquence a révélé que MutL est une ATPase de la superfamille GHKL (qui comprend aussi la gyrase, une topoisomérase de type II, Hsp90 et l'histidine kinase) (Dutta et Inouye, 2000). Les membres de cette famille partagent un site de fixation des nucléotides différent de celui que représente le classique motif de Walker A.

La fixation de l'ADPnP provoque la formation de structures secondaires permettant la dimérisation : une fois ordonnés, les boucles L1, L2, L3, L45 et l' « *ATP lid* » (acides aminés 74 à 97) constituent l'interface du dimère. Ces structures comprennent plusieurs résidus importants pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Ban et Yang, 1998a) (**Figure 4**). Un autre bouleversement structurel provoqué par la fixation de l'ADPnP est la formation de trois nouvelles surfaces, l'une pouvant servir à l'interaction avec MutH, la seconde avec MutS et la dernière avec l'ADN (Ban *et al.*, 1999).

Contrairement à MutS, qui possède une ATPase « Walker » classique, typique des protéines « moteurs » telles que les hélicases, MutL serait plutôt une protéine « signal », du fait de ses nombreuses interactions avec à peu près tous les acteurs du système. Fonctionnant à la manière d'un « interrupteur moléculaire » recrutant différentes protéines selon les étapes du processus de réparation de l'ADN, ce serait en fait la protéine qui coordonne le tout (Yang, 2000).

#### **4) Les autres acteurs du SRM**

La protéine MutH est une endonucléase monomérique capable d'agir sur le brin néosynthétisé au niveau d'un site hémiméthylé. Son activation est dépendante de la formation du complexe MutS-MutL-ATP au niveau du mésappariement (Schofield et Hsieh, 2003). Sa structure, déterminée par cristallographie aux rayons X, montre qu'elle possède deux domaines structuraux, le bras C et le bras N, qui forment en pivotant l'un par rapport à l'autre une gouttière flexible dans laquelle l'ADN vient se fixer. Cette structure est proche des endonucléases de type II telles que PvuII (Ban et Yang, 1998b). Malgré la résolution de cette structure, plusieurs hypothèses s'affrontent encore quant à la zone d'interaction de MutH avec MutL et le mécanisme précis d'activation de l'endonucléase par le complexe MutS-MutL-ATP reste à déterminer (Junop *et al.*, 2003). Enfin, si le rôle de MutH dans la réparation des mésappariements est largement établi, son rôle dans la prévention de la recombinaison n'est pas aussi clair, puisque ce phénomène peut être soit MutH-dépendant (10 à 20% des cas), soit MutH-indépendant (80 à 90% des cas). Dans ce dernier cas, les activités nucléase et hélicase du système RecBCD seraient impliquées à sa place (Stambuk et Radman, 1998).

UvrD est une hélicase de type II qui déroule l'ADN portant le mésappariement dans le cadre du SRM (Modrich et Lahue, 1996), mais qui intervient également dans le système UvrABCD de réparation par excision de nucléotides. Ce système agit en particulier sur les mésappariements résultant de dommages causés à l'ADN par des agents mutagènes (Petit et



Sancar, 1999). Son activation est sous la dépendance de MutL (Mechanic *et al.*, 2000). Cette protéine a la capacité de dérouler l'ADN sur une cinquantaine de nucléotides avant de se dissocier, or la zone de réparation (entre le mésappariement et le site hémiméthylé) peut atteindre 1 kb (Modrich et Lahue, 1996). On pense donc que MutL provoque en fait l'activation répétée de nombreuses hélicases II au cours du processus de réparation. De plus, cette enzyme possède une polarité unique  $3' \rightarrow 5'$ , donc il semble que c'est encore MutL qui la place sur le brin approprié pour permettre le déroulement de la structure dans le bon sens (Mechanic *et al.*, 2000).

La bidirectionnalité de la réparation constitue une particularité du SRM. Ainsi, le site hémiméthylé peut se trouver aussi bien en  $3'$  ou en  $5'$  du mésappariement (Modrich et Lahue, 1996). Selon le cas, des exonucléases différentes interviennent alors pour dégrader le brin portant l'erreur après sa coupure par l'endonucléase MutH : Exo VII et RecJ possédant une activité hydrolytique  $5' \rightarrow 3'$ , elles interviennent quand l'excision initiale a lieu en  $5'$  du mésappariement, tandis que dans le cas contraire, ce sont des exonucléases ayant une activité  $3' \rightarrow 5'$  qui sont requises : Exo I, Exo X et Exo VII (qui est bidirectionnelle) (Marti *et al.*, 2002).

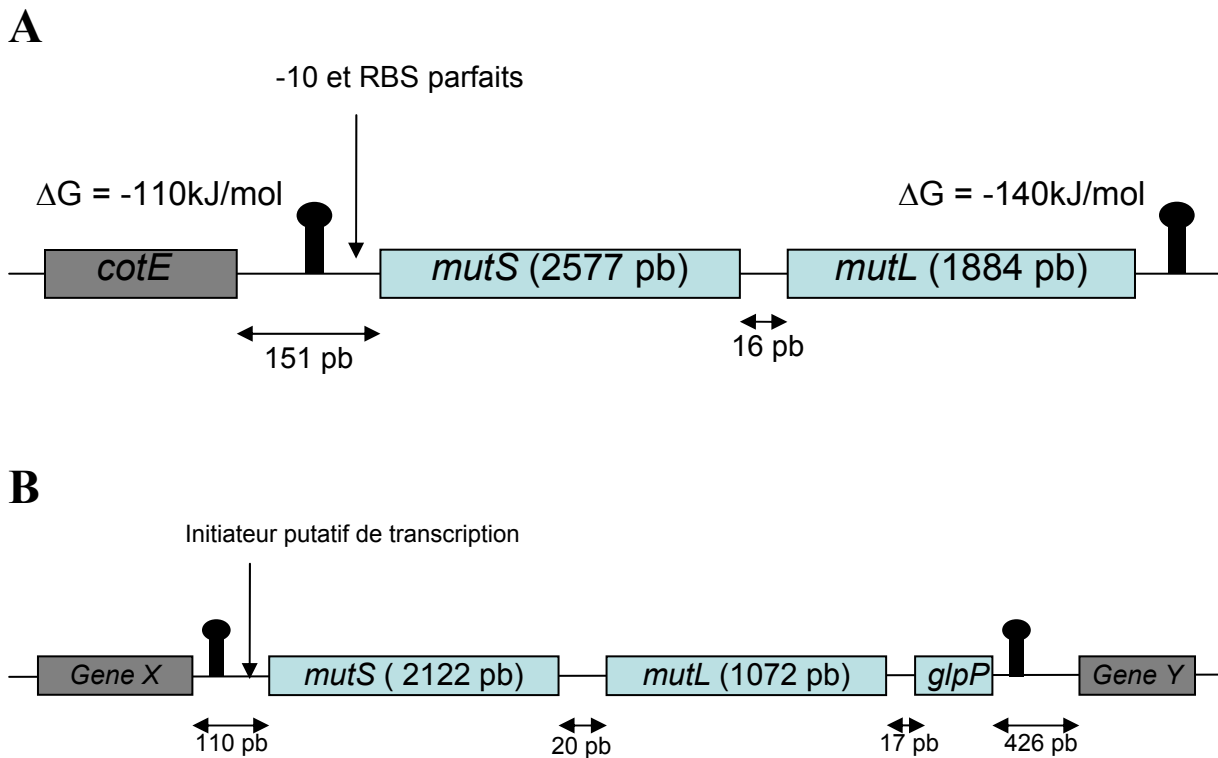
## **C. Le SRM chez les bactéries à Gram positif**

### **1) Le cas particulier des Gram positifs**

La base du SRM (les protéines MutS et MutL) est bien conservée chez tous les êtres vivants : des homologues ont été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif comme *B. subtilis* (Ginetti *et al.*, 1996) ou *Streptococcus pneumoniae* (Lacks *et al.*, 1982). Chez les eucaryotes, on en trouve aussi bien de la levure à l'homme (Kolodner, 1996 ; Marti *et al.*, 2002). Cependant, il existe des différences importantes. En effet, les protéines Dam et MutH, qui permettent la reconnaissance et l'excision du brin néosynthétisé, n'ont en fait été retrouvées que chez *E. coli* et quelques autres bactéries à Gram négatif (Eisen et Hanawalt, 1999). Chez les autres espèces, ces protéines semblent absentes. *Neisseria meningitidis*, par exemple, ne possède pas d'homologue de mutH et le gène *dam* n'est présent que chez certaines souches (Richardson et Stojiljkovic, 2001). Chez les bactéries à Gram positif étudiées à ce jour, comme chez les eucaryotes, il n'existe pas d'équivalent de *mutH* et surtout pas de système de méthylation. Par conséquent, toutes ces espèces doivent reconnaître le brin néosynthétisé d'une autre façon. L'hypothèse la plus probable est que cette discrimination se fonde sur la présence de cassures dans l'ADN entre les fragments d'Okasaki générés par la réplication (Lacks *et al.*,

1982 ; Mejean *et al.*, 1991 ; Modrich et Lahue, 1996). Dans ce cas, on suppose que l'action du SRM serait couplée à la réplication, peut-être par le biais de la pince glissante  $\beta$  chez les procaryotes, équivalente à la PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) des eucaryotes. Toutes deux permettent à la réplécase une fixation forte et un déplacement rapide le long de l'ADN, or leur interaction avec MutS et MutL semble indispensable au bon fonctionnement du système et elles sont toutes deux orientées de façon différente sur l'ADN par rapport au brin matrice et au brin néosynthétisé, ce qui permettrait leur discrimination (Umar *et al.*, 1996 ; Lopez de Saro et O'Donnell, 2001). Cette hypothèse a été confortée par des travaux sur le SRM de *B. subtilis* dans lesquels des fusions des protéines MutS et MutL avaient été réalisées avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*), permettant ainsi la visualisation de leur localisation dans la cellule au cours du processus de réparation. Les résultats obtenus montraient clairement une co-localisation de la majorité des complexes MutS-MutL avec le réplisome (Smith *et al.*, 2001).

Une autre caractéristique, particulière cette fois aux bactéries à Gram positif, est la structure en opéron des gènes *mutS* et *mutL*. A ce jour, celle-ci a été décrite chez *B. subtilis* (Ginetti *et al.*, 1996), *Listeria monocytogenes* (Merino *et al.*, 2002), *S. aureus* (O'Neill et Chopra, 2002) et *Enterococcus faecium* (Willems *et al.*, 2003) (**Figure 5**). Par contre, cette organisation n'existe pas chez *S. pneumoniae*, mais il a été observé que les gènes *hexA* et *hexB* (homologues de *mutS* et *mutL* chez cette espèce) présentent des séquences -10 et Shine-Dalgarno très conservées (Prudhomme *et al.*, 1989). Ces données sont en faveur de l'hypothèse d'une expression coordonnée des deux gènes, ce qui pourrait avoir une grande importance, non seulement pour éviter l'effet mutateur d'une production déséquilibrée d'un des deux éléments, mais aussi au vu des contraintes imposées par l'état de compétence lors de la transformation (Ginetti *et al.*, 1996). En effet, un SRM actif semble être requis pendant la phase de compétence pour empêcher les mésappariements car il pourrait être responsable de la correction des hétéroduplexes observée pendant la transformation (Bresler *et al.*, 1968).



**Figure 5.** Organisation de l'opéron *mutSL*. A. Opéron *mutSL* de *B. subtilis*. D'après Ginetti *et al.* (1996). B. Opéron *mutSL* de *L. monocytogenes*. D'après Merino *et al.* (2002).

Les terminateurs putatifs de transcription sont représentés par le symbole **T**, avec leur  $\Delta G$  quand il est connu. Les initiateurs de transcription ou de traduction détectés *in silico* sont indiqués. La taille des régions intergéniques est indiquée sous chaque double flèche.

## 2) *B. subtilis*

La découverte de l'opéron *mutSL* chez cette espèce a constitué la première description d'une structure de ce type (Ginetti *et al.*, 1996). La **figure 5A** en présente l'organisation. Une analyse *in silico* a permis de mettre en évidence la présence de deux terminateurs de transcription, l'un juste avant et l'autre juste après les deux gènes, d'un RBS et d'une séquence -10 parfaite en amont de *mutS*. De plus, *mutL* commence 16 pb après *mutS* et aucun terminateur ou promoteur n'a pu être identifié entre les deux gènes. Ces données laissent à penser que ces deux gènes appartiennent au même opéron.

Une souche en grande partie déletée pour ces deux gènes a été construite par les mêmes auteurs. Celle-ci présentait un taux de mutation spontanée sur rifampicine de 40 à 60 fois supérieur à la normale, un taux de réversion spontanée pour les marqueurs d'auxotrophie phénylalanine et isoleucine multiplié par 16 et une morphologie altérée suggérant la formation de clones incapables de sporuler. D'autre part, l'efficacité de transformation était identique pour des marqueurs présentant normalement des fréquences de transformation différentes chez la souche sauvage. Ces résultats suggèrent donc une implication du SRM de *B. subtilis* dans la réparation des mésappariements et dans la reconnaissance de certains hétéroduplexes formés lors de la transformation, empêchant leur intégration dans le chromosome.

Enfin, les auteurs ont aussi analysé l'expression de l'opéron grâce à la construction d'une fusion *mutS-lacZ*. La pousse de la souche obtenue sur milieu minimum a permis d'observer une légère augmentation de l'expression des gènes juste avant l'entrée en phase stationnaire, peut-être due à la fraction de cellules entrant en phase de compétence, suivie d'une diminution progressive. D'autre part, l'analyse de cette expression chez plusieurs mutants a montré que celle-ci n'était pas affectée par la mutation des gènes *com*, impliqués dans la régulation de la compétence tardive, alors que dans une souche *recA-*, la diminution de l'expression pendant la phase stationnaire observée chez la souche sauvage n'existait plus, suggérant un rôle possible de RecA (protéine catalysant l'échange des brins au cours de la recombinaison homologue) dans la régulation de l'expression du SRM chez *B. subtilis*.

L'implication de *mutSL* dans la recombinaison chez cette espèce a par la suite été analysée plus finement (Majewski et Cohan, 1998 ; Majewski et Cohan, 1999). Ces études ont montré, contrairement à l'hypothèse formulée plus haut, que *mutS* et *mutL* n'avaient qu'un effet très limité dans le contrôle de la recombinaison chez *B. subtilis*, et que la barrière la plus importante contre la recombinaison entre séquences trop divergentes était constituée par la nécessité d'une forte homologie de séquence aux deux extrémités des fragments donneur et receveur.

Une autre étude (Sasaki *et al.*, 2000) rapporte une analyse *in silico* sur l'ensemble du génome de *B. subtilis* et émet l'hypothèse de l'existence d'un homologue de *mutH* chez cette espèce. En effet, le produit du gène *nth* correspond à une endonucléase de type III présentant 16,5% d'identité avec MutH. L'étude de mutants a permis de conforter cette hypothèse puisque, si la fréquence de mutation sur rifampicine d'une souche *nth-* n'est que faiblement augmentée par rapport à la souche sauvage, le triple mutant *mutS-*, *mutL-*, *nth-* voit par contre cette valeur augmenter de façon plus importante que le double mutant *mutS-*, *mutL-*, ce qui correspond aux

mêmes résultats que ceux observés chez *E. coli* (Modrich, 1989). Les auteurs concluent en suggérant que *nth* pourrait être impliqué dans le SRM chez *B. subtilis*, mais aucune étude n'est venue depuis conforter leur hypothèse.

### 3) *L. monocytogenes*

Une seule étude, portant sur l'effet du phénotype mutateur chez *L. monocytogenes* sur la virulence des souches, présente une analyse de l'opéron *mutSL* chez cette espèce (Merino *et al.*, 2002). *In silico*, les gènes ont été identifiés par comparaison avec les séquences de *mutS* et *mutL* de *B. subtilis* et de *hexA* et *hexB* de *S. pneumoniae*, tandis qu'aucun homologue du gène *mutH* d'*E. coli* n'a pu être détecté. Une analyse fine de l'organisation génétique de la région *mutSL* a montré que les deux gènes appartenaient, comme chez *B. subtilis*, à un même opéron (**Figure 5B**). Des terminateurs de transcription forts ont été identifiés à chaque extrémité de la structure. L'opéron contient un gène supplémentaire par rapport à *B. subtilis* : un homologue de *glpP* (régulateur de l'entrée de glycérol dans la cellule) a en effet été détecté immédiatement en aval de *mutL*. Une analyse moléculaire par RT-PCR a permis de confirmer ces hypothèses en montrant que les trois gènes étaient co-transcrits sur un même ARNm.

La construction d'un mutant *mutSL*- a permis de mettre en évidence l'implication de ces gènes dans la réparation des mésappariements et la prévention de la recombinaison entre séquences d'ADN non homologues chez cette espèce. En effet, la fréquence de mutation sur rifampicine du mutant est augmentée de 200 fois par rapport à la souche sauvage et sur streptomycine et spectinomycine d'environ 60 fois. Cette augmentation est exacerbée après plusieurs générations supplémentaires, atteignant plus de 1700 fois la valeur observée chez la souche sauvage sur rifampicine après 100 générations. D'autre part, la fréquence de transduction à partir d'une souche donneuse présentant un génome divergent de 1% à 2% par rapport à la receveuse est augmentée de 10 à 15 fois chez le mutant par rapport à la souche sauvage. Cependant, cette étude rapporte également une virulence diminuée du mutant dans un modèle d'infection murin (chapitre D.1, page 30).

### 4) *S. pneumoniae*

Cette espèce a été particulièrement étudiée du fait de sa compétence naturelle. C'est en fait chez *S. pneumoniae* que le premier SRM a été mis en évidence et étudié. Très tôt, on a réalisé qu'il devait exister un système corrigeant les erreurs d'appariement au sein d'un ADN hétéroduple, et que celui-ci avait une influence sur l'efficacité de transformation grâce à un

mécanisme enzymatique (Lacks et Hotchkiss, 1960 ; Ephrussi-Taylor et Gray, 1966). A l'appui de cette hypothèse, des mutants *hex* furent par la suite isolés, qui pouvaient acquérir tous les marqueurs avec une très grande efficacité (Lacks, 1970). Ces mutants permirent également de démontrer l'implication du système *hex* dans la prévention des mutations spontanées (Tiraby et Fox, 1973). Par la suite, on identifia 2 loci dont les mutations provoquaient une augmentation du taux de mutation et de l'efficacité de transformation : *hexA* (homologue de *mutS*) et *hexB* (homologue de *mutL*) (Claverys *et al.*, 1984 ; Balganesch et Lacks, 1985). Les deux gènes furent identifiés et séquencés dans les années qui suivirent (Priebe *et al.*, 1988 ; Prudhomme *et al.*, 1989), et la comparaison avec les gènes de réparation des mésappariements d'autres espèces montra alors que ce système était quasi universellement conservé chez tous les êtres vivants (Priebe *et al.*, 1988 ; Haber *et al.*, 1988 ; Reenan et Kolodner, 1992). Ainsi, le gène *hexA* introduit chez *E. coli* confère à la souche un phénotype mutateur, sans doute en se fixant aux mésappariements et en empêchant leur réparation par le SRM de la souche (Prudhomme *et al.*, 1991). Au cours des 15 dernières années, de nombreuses études portant sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'intervention du système *hexAB* sur la recombinaison et la réparation des mésappariements ont été publiées (Mortier-Barriere *et al.*, 1997). Cependant, si le rôle du système *hex* dans la réparation des mésappariements est bien documenté, son efficacité dans la prévention de la recombinaison avait été mise en doute par une étude montrant que le système semblait saturé si la divergence entre l'ADN donneur et l'ADN receveur se situait entre 1% et 10% (Humbert *et al.*, 1995). Une étude récente a donc cherché à évaluer le rôle relatif de différents facteurs connus pour agir en empêchant la recombinaison, dont le système *hex*, chez *S. pneumoniae* (Majewski *et al.*, 2000). Les résultats obtenus montraient clairement que, si ce rôle n'est pas aussi important que celui tenu par *mutS* et *mutL* chez *E. coli*, il reste très significatif, contrairement à ce qui avait été observé chez *B. subtilis*.

Toutefois, une autre étude récente semble montrer que le système *hexAB* est polymorphe selon les souches, et que son implication dans l'hypermutableté des souches cliniques de *S. pneumoniae* est faible (Morosini *et al.*, 2003). En effet, sur 200 isolats cliniques, plus de 20% des souches présentaient une fréquence de mutation proche de celle d'un mutant *hexA*. Cependant, une analyse moléculaire fine de 13 souches choisies au hasard parmi les souches « mutatrices » ou non a mis en évidence des altérations ponctuelles du système *hexAB* chez toutes les souches (même celles qui présentaient une fréquence de mutation normale), et sa fonctionnalité a été confirmée par une capacité de transformation normale des souches.

## 5) *S. aureus*

Ce n'est que très récemment que l'étude du SRM a débuté chez cette espèce. Si l'on exclut les résultats présentés dans ce mémoire, une seule publication à ce jour rapporte une analyse moléculaire des gènes *mutS* et *mutL* de *S. aureus* (O'Neill et Chopra, 2002). Dans cette étude, les auteurs ont tout d'abord identifié les gènes sur le chromosome d'une souche de référence séquencée peu de temps auparavant, et constaté que ceux-ci semblaient être organisés en opéron. Une souche *mutS*- a été construite par l'intégration d'un plasmide thermosensible au milieu du gène. La fréquence de mutation de cette souche était augmentée sur les 4 antibiotiques testés, confirmant le rôle de *mutS* dans la réparation des mésappariements chez cette espèce. D'autre part, la complémentation du mutant a été réalisée en introduisant dans la souche un opéron complet cloné, et la fréquence de mutation des transformants était similaire à celle de la souche sauvage. Enfin, cette étude a analysé la fréquence de mutation de la souche sauvage et mutante à différents stades de la croissance, montrant ainsi que celle-ci n'était pas augmentée en phase stationnaire, contrairement à ce qui avait pu être observé chez *E. coli* (Feng *et al.*, 1996 ; Bjedov *et al.*, 2003 ; Loewe *et al.*, 2003).

## D. Rôle du SRM dans l'adaptation des bactéries à leur environnement, cas des bactéries pathogènes

### 1) Rôle du SRM dans la pathogénicité

Les efforts réalisés au cours des 150 dernières années par l'homme pour contrôler, voire éradiquer les maladies infectieuses sont en permanence remis en cause par le développement chez les microorganismes de nouvelles stratégies pour survivre à la pression exercée par les défenses immunitaires de l'hôte lui-même et par les traitements qui lui sont administrés, en plus de la compétition que leur imposent les bactéries commensales. L'existence de souches mutatrices parmi les bactéries isolées dans la nature est connue depuis plusieurs années. La première observation de ce type de souches remonte à une cinquantaine d'années : 2 souches mutatrices avaient été détectées parmi 25 isolats d'*E. coli* (Treffers *et al.*, 1954). Le même type d'observation a pu être répété par la suite (Jyssum, 1960 ; Gross et Siegel, 1981). Dans une étude plus récente, 9 souches mutatrices d'*E. coli* et 17 souches mutatrices de *Salmonella enteritidis* ont été détectées dans une collection de 212 et 137 isolats pathogènes, respectivement (LeClerc *et al.*, 1996). Les auteurs discutent d'ailleurs l'avantage potentiel du caractère mutateur pour les pathogènes, soulignant que l'étude de Jyssum (1960), qui portait uniquement sur des souches pathogènes, retrouvait 3,6% de mutateurs, tandis que celle de

Gross et Siegel (1981), qui incluait des souches pathogènes et commensales, ne trouvait que 0,24% de mutateurs. L'observation d'une proportion importante de mutateurs au sein de collections d'isolats pathogènes s'est multipliée depuis, et la relation entre les deux caractères (mutateur et pathogène) est de plus en plus étudiée. Par exemple, la présence de souches hypermutables a pu être reliée à la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte dans le phénomène de variation de phase par mutation chez *N. meningitidis* (Richardson et Stojiljkovic, 2001 ; Richardson *et al.*, 2002).

Dans la majorité des cas, c'est une inactivation d'un des gènes du SRM qui a été identifiée comme responsable de l'hypermutabilité des souches (LeClerc *et al.*, 1996 ; Matic *et al.*, 1997 ; Richardson et Stojiljkovic, 2001). De plus, il a été montré récemment que la diminution de la concentration cytoplasmique en protéine MutS qui est observée chez *E. coli* pendant la phase stationnaire de croissance était 6 fois plus importante chez une souche virulente que chez la souche de référence *E. coli* K12, suggérant que le pathogène pourrait être prédisposé à un phénotype hypermutateur transitoire, avantageux dans les conditions de stress que constitue la phase stationnaire (Li *et al.*, 2003).

Cependant, une relation formelle entre le caractère hypermutateur et la virulence des souches n'est pas établie (Taddei *et al.*, 1997a). Ainsi, chez *E. coli*, les taux de mutation des souches commensales et pathogènes semblent variables selon le type d'isolat (Matic *et al.*, 1997). D'autre part, une étude récente a détecté une proportion élevée de mutateurs dans des souches uropathogènes par rapport à des souches commensales, tandis que parmi des souches isolées de bactériémie, on trouvait plutôt moins de mutateurs que dans le groupe de souches commensales (Denamur *et al.*, 2002).

De plus, l'étude du comportement des mutateurs *in vivo* dans des modèles d'infection donne des résultats contradictoires : lors de la phase initiale de colonisation du tube digestif de souris axéniques, les souches d'*E. coli* mutatrices ont un avantage par rapport aux souches sauvages, mais une fois l'implantation réalisée, le phénotype mutateur est perdu (Giraud *et al.*, 2001a). Par contre, dans un modèle d'infection urinaire chez la souris, le phénotype mutateur d'*E. coli* est plutôt avantageux au stade tardif de l'infection malgré un coût initial important (Labat et Denamur, communication personnelle). D'autre part, la virulence de souches de *L. monocytogenes* mutatrices semble diminuée (Merino *et al.*, 2002), et celle des *Salmonella* reste identique à celle des souches sauvages, avec cependant une augmentation du laps de temps nécessaire à l'installation de l'infection chez la souris (Zahrt *et al.*, 1999). Une étude portant sur l'adaptation des *S. aureus* dans un modèle d'infection osseuse chronique chez le rat a montré



que le phénotype mutateur conférait un désavantage par rapport aux souches normales, tant au niveau de l'implantation que du développement dans l'os, mais que ce désavantage disparaissait en présence d'une pression de sélection antibiotique forte (Daurel et Fantin, communication personnelle). Enfin, une étude toute récente montre que les souches hypermutables sont très rares parmi les *P. aeruginosa* isolés d'infections nosocomiales sévères alors que beaucoup présentent des résistances aux antibiotiques par mutation (Gutierrez *et al.*, 2004). Les auteurs émettent donc l'hypothèse, soit que le phénotype hypermutable serait plutôt une caractéristique des infections chroniques, soit que ce caractère est défavorisé dans le cadre d'infections sévères, comme cela a pu être observé chez *L. monocytogenes*.

La question se pose donc, non pas de savoir si les souches hypermutables sont plus pathogènes que les autres, mais si parmi les pathogènes, il existe une différence entre les souches hypermutables et les autres souches (Giraud *et al.*, 2001b). Cette question a été étudiée dans un modèle de souris, où on a pu constater que la corrélation entre la virulence des souches et le nombre de facteurs de pathogénicité présents dans la souche, qui existent chez les bactéries sauvages, disparaît chez les mutateurs (Picard *et al.*, 2001). D'autre part, l'étude de souches pathogènes isolées dans le cadre de la mucoviscidose a montré (chapitre E.2, page 43) que la proportion de souches hypermutables était souvent plus importante que celle observée pour la même espèce chez des souches isolées d'autres infections (Oliver *et al.*, 2000 ; Roman *et al.*, 2004). Ces études établissent toutes un lien entre l'hypermutabilité et la résistance aux antibiotiques. Par conséquent, on peut penser que l'hypermutabilité confère un avantage aux bactéries dans certaines pathologies. D'ailleurs, des études théoriques et *in vitro* ont montré que des populations clonales colonisant des environnements fluctuants, comme c'est le cas dans la mucoviscidose, favorisaient l'apparition des sous-populations hypermutables (Sniegowski *et al.*, 1997 ; Taddei *et al.*, 1997b ; Tenaillon *et al.*, 1999). En effet, les infections chroniques offrent les meilleures conditions pour la fixation d'allèles mutateurs, aussi bien au niveau de la taille de la population, de la durée de l'infection, ou encore des pressions répétées exercées à la fois par les traitements antibiotiques de longue durée et la réponse immunitaire de l'hôte. Des taux de mutation élevés permettraient en effet l'apparition de mutations conférant la résistance aux antibiotiques (Mao *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 1999), en même temps que la possibilité pour les bactéries de générer des mutations compensatoires au coût biologique de cette résistance (Levin *et al.*, 2000), comme nous allons le voir plus en détails dans le chapitre suivant.

## 2) Rôle du SRM dans la résistance aux antibiotiques

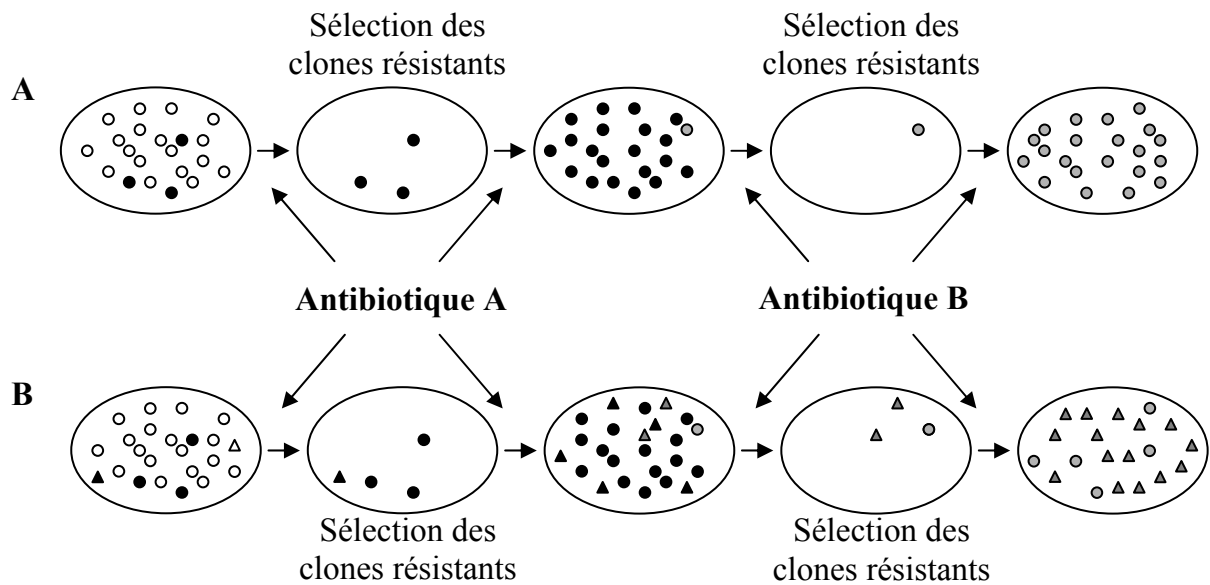
L'utilisation des antibiotiques, de plus en plus répandue depuis leur découverte au début du XXème siècle, a conduit au développement et à la dissémination de bactéries résistantes. Un certain nombre des mécanismes impliqués dans cette résistance reposent au départ sur une mutation, soit de la cible de l'antibiotique, soit d'une structure impliquée dans l'efflux ou la dégradation de cet antibiotique (Spratt, 1994 ; Livermore, 2003). Par conséquent, l'existence, dans une population de bactéries pathogènes confrontée à un traitement antibiotique, de variants présentant un taux de mutation élevé lui confère un avantage certain, puisque ceux-ci ont plus de chance de développer une mutation provoquant la résistance de la souche (Blazquez, 2003).

Un lien hypothétique entre hypermutabilité et résistance aux antibiotiques existe en fait depuis longtemps, puisque dès le premier article décrivant la forte proportion de souches hypermutables parmi les pathogènes isolés chez l'homme (LeClerc *et al.*, 1996), le lien entre hypermutabilité et acquisition de multiples résistances, soit par mutation, soit par acquisition de gènes, est évoqué. Depuis, de nombreuses expériences réalisées sur des souches de laboratoire viennent régulièrement confirmer cette hypothèse. Ainsi, les mutateurs pourraient faciliter la modification des sites actifs des enzymes de détoxification, permettant de passer d'une résistance de bas niveau à une résistance de haut niveau (Tanabe *et al.*, 1999). De plus, les souches hypermutables semblent capables d'étendre leur spectre de résistance (Orencia *et al.*, 2001), et elles peuvent accumuler des mutations compensatoires du coût biologique de la résistance (Bjorkman *et al.*, 2000). Plusieurs autres études viennent encore appuyer ces constatations : (Miller *et al.*, 2002 ; Negri *et al.*, 2002) montrent ainsi que les mutateurs présentent un risque fort d'émergence de nouvelles résistances en présence d'antibiotiques, aussi bien chez *E. coli* que chez *S. pneumoniae*, et Alonso *et al.* (1999) montrent que l'émergence de mutants résistants à plusieurs antibiotiques (mutants MDR Multi Drug Resistant) est facilitée chez les *P. aeruginosa* mutateurs. C'est d'ailleurs chez cette espèce que la seule étude établissant un lien tangible entre hypermutabilité des souches cliniques et résistance aux antibiotiques a été réalisée (Oliver *et al.*, 2000). Ces travaux montraient en effet que la proportion de souches résistantes à 6 antibiotiques différents était significativement plus élevée parmi les souches hypermutables isolées de mucoviscidose que parmi les souches non mutatrices. Ces résultats ont été récemment confirmés *in vitro* par l'étude du comportement en présence de différents antibiotiques d'un mutant *mutS* (Smania *et al.*, 2004), et mis à profit pour la mise au point d'un test permettant la détection rapide de souches hypermutables au

laboratoire, basé sur l'existence de sous-populations résistantes aux antibiotiques dans la population hypermutable (Macia *et al.*, 2004).

Globalement, de nombreuses études confirment donc l'hypothèse de Mao *et al.* (1997) selon laquelle une sélection quelle qu'elle soit provoque l'augmentation de la proportion des souches hypermutables dans la population. Ainsi, Negri *et al.* (2002) ont étudié la prolifération des mutateurs dans une population expérimentale de *S. pneumoniae* contenant un mélange à part égale d'une souche sauvage et d'une souche *hexA*. Ils ont montré que la souche *hexA* est sélectionnée en présence d'une faible concentration d'antibiotique, et que la fréquence de mutation globale de la population sur d'autres antibiotiques est augmentée, constituant ainsi un modèle pour illustrer le risque que représente la sélection de variants hypermutables dans l'évolution de multiples résistances aux antibiotiques. Il a aussi été montré *in vivo* que certains traitements antibiotiques peuvent sélectionner les mutateurs présents en petite proportion dans la population : en sélectionnant la résistance, la pression sélective d'antibiotiques sélectionne également l'allèle mutateur comme mécanisme générant la mutation. L'étude de (Giraud *et al.*, 2002) montre ainsi dans un modèle de souris axénique qu'en plus de sélectionner directement les clones résistants, un traitement antibiotique peut aussi sélectionner les mutateurs. L'échec du premier traitement augmente alors la probabilité d'échec d'un second traitement avec un autre antibiotique du fait de la fréquence de mutation élevée des variants sélectionnés. Les auteurs concluent en recommandant l'utilisation, dans les pathologies connues pour favoriser l'apparition de mutateurs, d'antibiotiques peu sélectionnants pour ces variants ou de combinaisons d'antibiotiques peu sélectionnants.

La **figure 6** (Blazquez, 2003) résume les deux *scenari* envisageables lorsqu'une population bactérienne est soumise à une pression de sélection par les antibiotiques. Dans le premier cas de figure, qui correspond au schéma classique d'acquisition et d'accumulation de résistances, il existe au sein d'une population quelques variants ayant acquis la résistance, qui sont sélectionnés en présence de l'antibiotique, tandis que les autres sont éliminés. Ces variants résistants deviennent donc prédominants dans la population après quelques générations, et peuvent à leur tour générer de nouveaux variants résistants à un autre antibiotique (**Figure 6A**). Nous avons vu qu'il existe par ailleurs des preuves indiquant que les antibiotiques peuvent agir comme promoteurs indirects de la résistance, dans le cas des populations contenant une petite proportion de souches hypermutables en particulier. Dans ce cas, l'augmentation de cette proportion provoquée par une première sélection sélectionne indirectement une capacité augmentée à acquérir la résistance à d'autres antibiotiques (**Figure 6B**).



**Figure 6.** Schéma présentant la réponse mutationnelle d'une population bactérienne à des pressions d'antibiotiques successives. D'après Blazquez (2003). **A.** Cas général : une dose létale d'antibiotique A sélectionne les clones résistants préexistants (ronds noirs), qui deviennent les seuls à pouvoir pousser en présence de cet antibiotique. Quand la population a atteint une taille suffisante, des mutants résistants à l'antibiotique B peuvent apparaître au hasard (ronds gris). L'administration de ce nouvel antibiotique va provoquer la sélection de ces nouveaux variants, résistants à la fois aux antibiotiques A et B. Ce scénario de sélection continue survient lorsque les populations ont suffisamment de temps pour atteindre une taille suffisante et acquérir par hasard de nouvelles mutations. **B.** Cas où il existe des mutateurs au sein de la population. Comme dans le premier cas, une dose létale d'antibiotique A sélectionne les clones résistants préexistants, mais ici il existe parmi ceux-ci un mutateur (Triangle noir). Cette fois encore, les clones résistants survivent et se multiplient, mais la proportion de mutateurs est alors augmentée par rapport à la population de départ. Leur fréquence de mutation élevée donne aux mutateurs plus de chances de produire des variants résistants à l'antibiotique B (triangles gris), ce qui leur permet de devenir prédominants quand l'antibiotique B est administré. La probabilité finale d'acquérir plusieurs résistances successives par mutation est augmentée puisque quasiment toute la population est constituée de mutateurs.

Cependant, quelques travaux remettent en question la généralisation de ce principe. Ainsi, l'étude réalisée par Gustafsson *et al.* (2003) montre que chez les bactéries commensales, si les traitements antibiotiques administrés ont un effet marqué sur l'augmentation de la résistance à ces antibiotiques, ils n'ont qu'un effet limité sur l'augmentation de la fréquence de mutation des souches. D'autre part, Denamur *et al.* (2002) rapportent que les antibiotiques ne semblent pas constituer le facteur principal de pression sélective favorisant l'apparition de mutateurs parmi les isolats naturels d'*E. coli*, puisque les mutateurs détectés dans leur étude ne sont pas plus résistants aux antibiotiques d'usage clinique courant que les souches non mutatrices. On peut donc penser que dans le cas des bactéries pathogènes, ce ne sont pas seulement les traitements antibiotiques administrés aux patients qui sont responsables de la forte proportion de souches hypermutables, mais surtout l'environnement fluctuant et hostile que les tissus ou organes infectés constituent pour le pathogène.

D'autre part, chez le staphylocoque, il y a une controverse concernant l'implication de l'hypermutabilité dans l'acquisition de résistance. Ainsi, si Schaaff *et al.* (2002) émettent l'hypothèse que l'hypermutabilité est un facteur important dans l'apparition de clones de *S. aureus* présentant une résistance intermédiaire à la vancomycine (antibiotique nécessitant l'accumulation de plusieurs mutations pour s'exprimer), leurs travaux ont été contredits par O'Neill et Chopra (2002). Aucun lien direct n'a finalement été clairement établi entre les deux phénomènes (O'Neill et Chopra, 2003) (et *Author's reply* page suivante), et une étude récente réalisée sur un petit nombre de souches ayant acquis plus ou moins rapidement une résistance intermédiaire à la vancomycine n'a pu détecter aucune altération de MutS (Muthaiyan *et al.*, 2004). D'un autre côté, chez *E. faecium*, Willems *et al.* (2003) ont cherché à établir une relation entre la résistance au linézolide (un nouvel antibiotique dont la résistance est provoquée par une mutation de l'ARNr 23S) et l'augmentation de la fréquence de mutation mais en dépit du polymorphisme des gènes *mutSL* chez les souches résistantes, aucun isolat hypermutable n'a pu être mis en évidence.

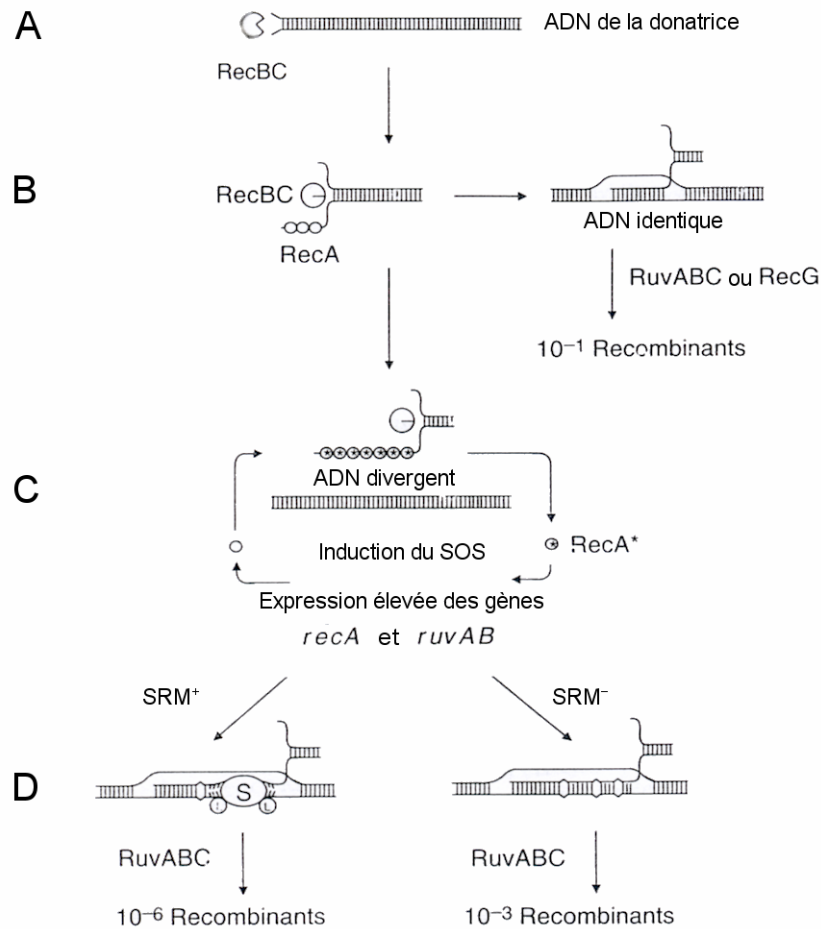
En conclusion, même si le lien entre hypermutabilité et résistance aux antibiotiques n'est pas encore clairement établi de façon certaine, un faisceau de présomptions important est à prendre en compte, particulièrement dans le cadre des infections chroniques de type mucoviscidose.

### 3) Rôle du SRM dans la recombinaison

Chez les eucaryotes, le brassage génétique est obligatoire, du fait de la diploïdie des organismes et des phénomènes de recombinaison génétique qui en découlent. Chez les bactéries, l'haploïdie rend la possibilité d'échanges génétiques par recombinaison facultative, et ceux-ci ne peuvent être observés que lors des phénomènes de transduction, transformation et conjugaison. Ces phénomènes compensent l'isolement génétique des microorganismes en autorisant des échanges inter-espèces, conférant au génome une certaine plasticité et permettant aux individus de s'adapter à des conditions environnementales défavorables. La recombinaison génétique est le mécanisme moléculaire sous-jacent à ces phénomènes, et sa régulation établit la barrière entre les espèces bactériennes (Smith *et al.*, 1991).

Le processus de recombinaison est contrôlé par la taille et le degré d'identité partagés entre les fragments d'ADN (Shen et Huang, 1986 ; Petit *et al.*, 1991 ; Zawadzki *et al.*, 1995). Même une divergence inférieure à 1% peut fortement inhiber la recombinaison aussi bien chez les procaryotes (Zahrt et Maloy, 1997 ; Vulic *et al.*, 1999) que chez les levures (Datta *et al.*, 1997) et les mammifères (de Wind *et al.*, 1995). La fréquence de recombinaison diminue de façon exponentielle avec le degré de divergence entre l'ADN étranger et l'ADN de la receveuse, aussi bien chez *B. subtilis* (Zawadzki *et al.*, 1995), *E. coli* (Vulic *et al.*, 1999), ou *S. pneumoniae* (Majewski *et al.*, 2000) que chez la levure (Datta *et al.*, 1997). Le succès de la recombinaison nécessite la réalisation des étapes suivantes : (1) entrée de l'ADN étranger dans la cellule receveuse, (2) l'ADN étranger échappe au système de restriction de la receveuse, (3) formation d'un intermédiaire hétéroduplexe entre l'ADN étranger et l'ADN receveur, (4) l'hétéroduplexe échappe au SRM, (5) fonctionnement correct du produit du nouveau gène, compatible avec le *background* génétique et physiologique de la receveuse (Majewski et Cohan, 1998).

Les mécanismes moléculaires contrôlant les échanges génétiques entre bactéries, dans l'état actuel de nos connaissances, semblent impliquer en fait deux systèmes enzymatiques clés : le SRM et le système SOS (Matic *et al.*, 1996). Le SRM agirait comme un inhibiteur de la recombinaison homéologue (entre séquences d'ADN divergentes) alors que le système SOS en serait un régulateur positif inductible. La **figure 7** consiste en une représentation simplifiée du fonctionnement moléculaire de la recombinaison bactérienne chez *E. coli*, montrant l'implication des deux systèmes.



**Figure 7.** Représentation schématique des mécanismes moléculaires impliqués dans la recombinaison entre séquences d'ADN homologues ou homéologues. D'après Matic *et al.* (1996). **A.** L'ADN étranger répliqué se présente sous une forme double brin. Il est déroulé par le système RecBC (hélicase). **B.** La protéine RecA se polymérise sur l'ADN simple brin généré et catalyse la recherche d'une séquence homologue dans l'ADN de la receveuse. Si celle-ci est identique à l'ADN étranger, un système classique de recombinaison homologue (RuvABC ou RecG) intervient pour terminer le processus. **C.** Si la protéine RecA ne trouve pas d'homologie à l'ADN simple brin dans le matériel génétique de la receveuse, elle est activée (RecA\*) et régule positivement le système SOS, qui active à son tour la production de RecA et RuvAB, stimulant la recombinaison homéologue. **D.** La formation de l'hétéroduplexe provoque la fixation de MutS (S) et MutL (L) au niveau des mésappariements, ce qui bloque le processus d'échange de brins catalysé par RecA et diminue fortement la fréquence de recombinaison.

N.B. : les chiffres donnés correspondent aux valeurs observées lors de la recombinaison chez *E. coli* après conjugaison avec une souche de la même espèce ou avec une souche de *Salmonella typhimurium*.

L'ADN étranger, à son entrée dans la cellule receveuse, est répliqué par sa machinerie cellulaire, ce qui permet sa prise en charge par le système enzymatique RecBC (hélicase) qui le déroule. La protéine RecA vient se fixer sur l'ADN simple brin généré et catalyse la recherche d'une séquence homologue au sein de l'ADN de la receveuse. Si celle-ci est trouvée, la recombinaison est réalisée par les enzymes RuvAB ou RecG, donnant dans le cas de croisements intra-espèce chez *E. coli* une fréquence de recombinaison de  $10^{-1}$ . Par contre, s'il n'existe pas de séquence homologue, la protéine RecA est activée par la persistance d'une grande quantité d'ADN simple brin, ce qui stimule le système SOS, lui-même inducteur de RecA et du système RuvAB, provoquant la formation d'ADN hétéroduplexe. Si la receveuse possède un SRM fonctionnel, celui-ci intervient alors en se fixant au niveau des mésappariements générés par le processus, ce qui diminue fortement la fréquence de recombinaison. Si la cellule est SRM-, la recombinaison homéologue est facilitée, mais reste 100 fois moins importante qu'entre séquences homologues (Matic *et al.*, 1996). Nous nous limiterons ici à décrire le rôle du SRM dans le processus.

Le SRM est un inhibiteur potentiel de la recombinaison entre génomes de bactéries phylogénétiquement proches et entre séquences d'ADN non identiques en général. (Matic *et al.*, 1995). En effet, la concentration de protéine MutS et MutL modifie la longueur de la portion d'ADN homologue nécessaire à la réussite de la recombinaison (Vulic *et al.*, 1997). Ainsi, l'inactivation des gènes *mutS* ou *mutL* provoque l'augmentation d'un facteur 1000 de l'efficacité de conjugaison et d'un facteur 100 de l'efficacité de transduction entre *E. coli* et *S. typhimurium*, qui sont divergents de 16% au niveau de la séquence d'ADN (Rayssiguier *et al.*, 1989). Réciproquement, la surproduction des protéines MutS et MutL diminue fortement la fréquence de recombinaison, même entre souches bactériennes très proches (Vulic *et al.*, 1997). Cependant, dans l'état actuel des connaissances rapportées dans la littérature, le rôle précis joué par MutS et MutL dans la prévention de la recombinaison homéologue reste spéculatif. Les études montrent que les mutations des gènes *mutS* ou *mutL* qui ont un effet sur la réparation des mésappariements agissent aussi sur la recombinaison, suggérant que les deux phénomènes impliquent les mêmes complexes *mutSL* chez *E. coli* (Junop *et al.*, 2003). Cependant, si MutS et MutL agissent en effet sur la recombinaison, l'implication de MutH est plus floue (chapitre B.4, page 23). Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes sous-jacents impliqués. La première propose que le phénomène de migration de branche catalysé par RuvAB soit stoppé ou même inversé par un phénomène de rejet de l'hétéroduplexe (Radman, 1989). Des observations ont été rapportées à l'appui de cette hypothèse dans des études



biochimiques (Worth, Jr. *et al.*, 1994 ; Fabisiewicz et Worth, Jr., 2001), qui montrent que MutS et MutL diminuent le taux et l'étendue de la formation d'hétéroduplexes catalysées par RecA et qu'ils inhibent le phénomène de migration de branche catalysé par RuvAB quand l'hétéroduplexe contient trop de mésappariements. Une seconde possibilité est que la fixation de MutS et MutL au niveau des mésappariements perturbe les phénomènes de résolution de l'intermédiaire de recombinaison selon le modèle de Holliday, empêchant le crossing-over effectif entre les brins d'ADN (Alani *et al.*, 1994). Enfin, une dernière possibilité est que l'évènement de recombinaison soit empêché par l'excision de l'ADN stimulée par les mésappariements, particulièrement quand le degré de divergence est faible, ce qui correspondrait alors aux cas où MutH et UvrD sont impliqués dans le phénomène (Feinstein et Low, 1986). Lorsque la divergence est forte, le mécanisme correspondrait plutôt à l'une des deux hypothèses évoquées ci-dessus, ramenant alors aux cas où MutH et UvrD ne sont pas requis (Rayssiguier *et al.*, 1989) (chapitre B.4, page 23).

Si l'implication du SRM chez *E. coli* est effectivement la cause majeure de l'inhibition de la recombinaison entre séquences d'ADN trop divergentes, il semble que dans d'autres espèces, la prédominance de ce mécanisme ne soit pas si évidente. Ainsi, chez *B. subtilis*, le SRM n'a qu'un effet marginal sur le phénomène, puisque la barrière la plus significative est constituée par la nécessité d'une homologie quasi parfaite entre les extrémités des deux brins à échanger (Majewski et Cohan, 1998 ; Majewski et Cohan, 1999). Chez *S. pneumoniae*, l'implication du système *hexAB* dans la prévention de la recombinaison homéologue est bien documentée (Mortier-Barriere *et al.*, 1997), mais il semble que la situation soit intermédiaire entre *E. coli* et *B. subtilis*, avec une participation significative des deux facteurs dans l'inhibition du processus (Majewski *et al.*, 2000), comme chez *Saccharomyces cerevisiae* (Datta *et al.*, 1997).

Les conséquences de la recombinaison dans l'évolution et l'adaptation des bactéries à l'environnement sont multiples. A titre d'exemple, elle peut permettre de diminuer le coût biologique de l'accumulation de mutations délétères chez les mutateurs en autorisant la récupération de matériel exogène non muté (Radman *et al.*, 2000). Elle catalyse également un retour à l'état sauvage des souches hypermutables par la réacquisition de gènes mutateurs fonctionnels (Denamur *et al.*, 2000) (chapitre A, page 16).

## **E. Hypermutableté et mucoviscidose**

### **1) Quelques données sur la mucoviscidose**

#### **a) Origine de la maladie**

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive portant sur le gène codant pour la protéine CFTR. Elle est considérée comme « la plus fréquente des maladies génétiques » puisqu'elle touche environ 1 naissance sur 3500 par an en France. On estime que le nombre de malades est d'environ 5 à 6000 en France et autour de 60000 personnes dans le monde. Depuis la découverte du déterminant génétique responsable de la maladie en 1989 (Rommens *et al.*, 1989 ; Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989), les mécanismes moléculaires responsables de la maladie sont beaucoup mieux compris. Le rôle essentiel du CFTR est de faire transiter le chlore à travers les membranes des cellules de l'épithélium pulmonaire, de la vésicule biliaire et du pancréas. Chez les malades, cette circulation de chlore étant amoindrie, le fonctionnement des organes cités est affecté. Au niveau pulmonaire, le mucus qui tapisse les bronches est épaissi et favorise le développement d'infections et d'inflammations des tissus.

#### **b) Infections bronchiques associées**

La colonisation bactérienne survient très tôt dans l'histoire de la maladie. Les premiers germes en cause sont *Haemophilus influenzae* et *S. aureus*, qui sont des commensaux normaux des voies aériennes supérieures. Ils sont retrouvés dans les poumons de la majorité des patients de moins de 10 ans. Le plus souvent, ils précèdent de quelques mois à plusieurs années la colonisation à *P. aeruginosa*, qui est un organisme environnemental commun ne se comportant comme un pathogène que sous certaines conditions opportunes. À l'âge de 18 ans, 80% des patients sont colonisés par *P. aeruginosa*, mais des co-colonisations par plusieurs germes ne sont pas rares. Le rôle de ces infections broncho-pulmonaire dans la mortalité des patients atteints est bien établi. Elles sont responsables à la fois des épisodes d'infection provoquant une inflammation aigüe des tissus, et d'une dégradation progressive de la fonction pulmonaire chez les malades.

Les bactéries impliquées dans l'infection de cet environnement très particulier que constituent les poumons des patients atteints de mucoviscidose semblent mettre en jeu des processus adaptatifs ciblés qui ont parfois pour conséquence de modifier leur propre physiologie. Ainsi, les *P. aeruginosa* isolés chez ces malades présentent fréquemment un

phénotype dit mucoïde qui leur permettent d'échapper en partie à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, ce germe présente la particularité, dans cet environnement, de former des biofilms qui augmentent sa résistance aux défenses de l'hôte mais également aux traitements antibiotiques administrés (Lyczak *et al.*, 2002). Concernant *S. aureus*, des sous-populations de SCV (*Small Colony Variant*) sont fréquemment retrouvées dans les prélèvements issus de mucoviscidose (Kahl *et al.*, 1998). Ces variants présentent une physiologie très particulière, avec une croissance ralentie, mais une résistance accrue aux systèmes de défense immunitaire de l'hôte et aux traitements antibiotiques (Baumert *et al.*, 2002). Récemment, une étude a montré qu'il semble exister une relation entre l'hypermutableté et l'émergence de SCV (Schaaff *et al.*, 2003).

### **c) Traitements antibiotiques administrés aux malades**

L'antibiothérapie développée depuis une cinquantaine d'années chez les patients atteints de mucoviscidose a permis une augmentation significative de la qualité et de la durée de vie des malades. L'espérance de vie moyenne est passée de 14 ans en 1969 à plus de 30 ans aujourd'hui (Ramsey, 1996). Actuellement, différentes stratégies thérapeutiques sont préconisées selon l'âge, l'état général et le type d'infection chez le malade. La plupart du temps, il s'agit de lui administrer une combinaison d'antibiotiques, parfois sur de longues périodes, pour leur effet synergique à la fois sur les germes en cause et sur l'amélioration de la fonction pulmonaire en général (McCaffery *et al.*, 1999 ; Lyczak *et al.*, 2002).

Des études récentes ont montré que les macrolides, et en particulier l'azithromycine, pouvaient avoir un effet bénéfique à des concentrations sub-inhibitrices administrées sur de longues périodes sur les patients colonisés par *P. aeruginosa* (Wolter *et al.*, 2002 ; Wozniak et Keyser, 2004). Dans ce cas, la molécule n'est pas utilisée pour son action directe sur le germe, puisque *P. aeruginosa* est naturellement résistante aux macrolides, comme les autres bactéries à Gram négatif, mais pour un effet anti-inflammatoire et diminuant la capacité d'adhésion du microorganisme (Tateda *et al.*, 2001 ; Carfartan *et al.*, 2004). La conséquence de ces études est que ces antibiotiques sont maintenant de plus en plus utilisés par les pédiatres, sans tenir compte d'une éventuelle co-colonisation des patients par *S. aureus*, qui est alors soumis à une pression de sélection extrêmement forte dans des conditions favorisant particulièrement l'apparition de mutant résistants (traitement de longue durée).

En résumé, de nombreux traitements antibiotiques, souvent prolongés, sont mis en jeu dans le cadre de la mucoviscidose. Ils exercent une pression constante sur les bactéries

responsables des infections pulmonaires des patients. Ajoutée à la pression exercée par les changements fréquents dans la structure physique et la physiologie des voies respiratoires chez les malades, causés par l'inflammation et les dommages provoqués par la réponse immunitaire, c'est un véritable challenge de l'adaptation qui est imposé aux bactéries. Elles risquent donc d'être amenées à acquérir un équipement d'évolution de haut niveau et à augmenter leur probabilité d'acquisition de nouveau phénotype, comme par exemple une virulence exacerbée (Rainey et Moxon, 2000).

## **2) Phénotype hypermutable des bactéries isolées chez les malades**

La première étude rapportant la caractérisation de souches hypermutables isolées chez des patients atteints de mucoviscidose est parue dans *Science* en 2000 (Oliver *et al.*, 2000). Les nombreux travaux réalisés au cours des années précédentes, montrant que l'adaptation des bactéries à un environnement hétérogène et changeant permettait la sélection de variants hypermutables, ont poussé les auteurs à émettre l'hypothèse d'une forte prévalence des *P. aeruginosa* hypermutables parmi les souches isolées de mucoviscidose par rapport aux souches isolées d'autres infections. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement : sur 128 isolats (30 patients), 19,5% présentaient une fréquence de mutation augmentée sur rifampicine, alors qu'aucun isolat provenant d'autres pathologies ne pouvait être considéré comme mutateur. Une étude épidémiologique en RAPD a permis de conclure que tous les mutateurs avaient subi cette évolution au sein des patients, chacun présentant un profil différent. Une analyse de l'activité différentielle des antibiotiques sur les souches mutatrices ou non a également mis en évidence une différence significative entre les proportions de souches résistantes pour 8 antibiotiques couramment utilisés dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. Une étude complémentaire réalisée par la suite (Oliver *et al.*, 2002) a montré que sur les 11 souches mutatrices, 7 présentaient des altérations du SRM (4 souches *mutS*-, 2 *mutL*- et une *uvrD*-).

Le second microorganisme retrouvé dans la mucoviscidose et pour lequel des études similaires ont été réalisées est *S. aureus*. Une première étude montrant l'implication de *mutS* dans le phénotype mutateur chez cette espèce est parue en 2002 (O'Neill et Chopra, 2002). En plus de l'étude moléculaire portant sur le gène *mutS* (chapitre C.5, page 30), ces travaux ont recherché la présence de souches mutatrices dans une collection de 493 souches, dont 49 isolées de mucoviscidose. Une seule souche présentait une fréquence de mutation légèrement supérieure à la normale, mais celle-ci n'était pas stable. Les résultats présentés dans l'article 3

de ce mémoire ont ensuite été à l'encontre de ces observations, démontrant qu'une proportion importante de souches hypermutables pouvait être détectée parmi les souches isolées de mucoviscidose, contrairement aux souches isolées d'autres pathologies (Prunier *et al.*, 2003). L'absence de détection de telles souches dans la première étude pourrait être attribuée à la taille trop réduite de la population étudiée, à des différences selon les patients, ou encore à la méthodologie utilisée.

Enfin, une étude publiée en 2004 sur la dynamique de colonisation sur le long terme du tractus respiratoire des malades par *H. influenzae* montre que la proportion de souches hypermutables est là encore plus importante que parmi les souches isolées d'autres pathologies (Roman *et al.*, 2004). Ce travail très complet a porté sur 188 souches isolées chez 30 patients sur des périodes allant de 1 à 7 ans. Il a montré qu'une même souche peut persister chez certains patients sur une période très longue (jusqu'à plus de 4 ans) et que ce phénomène est en général associé à la résistance aux antibiotiques, mais que la plupart du temps, c'est plutôt un phénomène de co-colonisation par plusieurs souches qui est retrouvé. De plus, les auteurs ont constaté que les souches isolées de mucoviscidose étaient en général beaucoup plus résistantes aux antibiotiques que celles isolées d'autres pathologies. Enfin, 14,5% des souches étudiées présentaient un caractère mutateur contre seulement 1,4% de souches mutatrices dans un panel de 71 souches non isolées de mucoviscidose. Une deuxième étude a confirmé tout récemment ces résultats en isolant, parmi 500 souches pathogènes de cette espèce, 14 mutateurs dont 12 provenaient de patients atteints de mucoviscidose, avec une majorité contenant des altérations de MutS. Six des mutateurs provenaient du même patient et correspondaient en fait au même clone au sein duquel on observait une augmentation de la CMI de l'antibiotique administré au patient pendant la période d'isolement des souches (Watson, Jr. *et al.*, 2004).

## II. LES MACROLIDES ET APPARENTES (MLS)

Les macrolides représentent l'un des principaux groupes d'antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine et constituent avec les lincosamides et streptogramines une famille d'antibiotiques, les MLS, de structures différentes mais présentant des mécanismes d'action et un spectre antibactérien similaire.

### A. Structure et classification

#### 1) Les macrolides

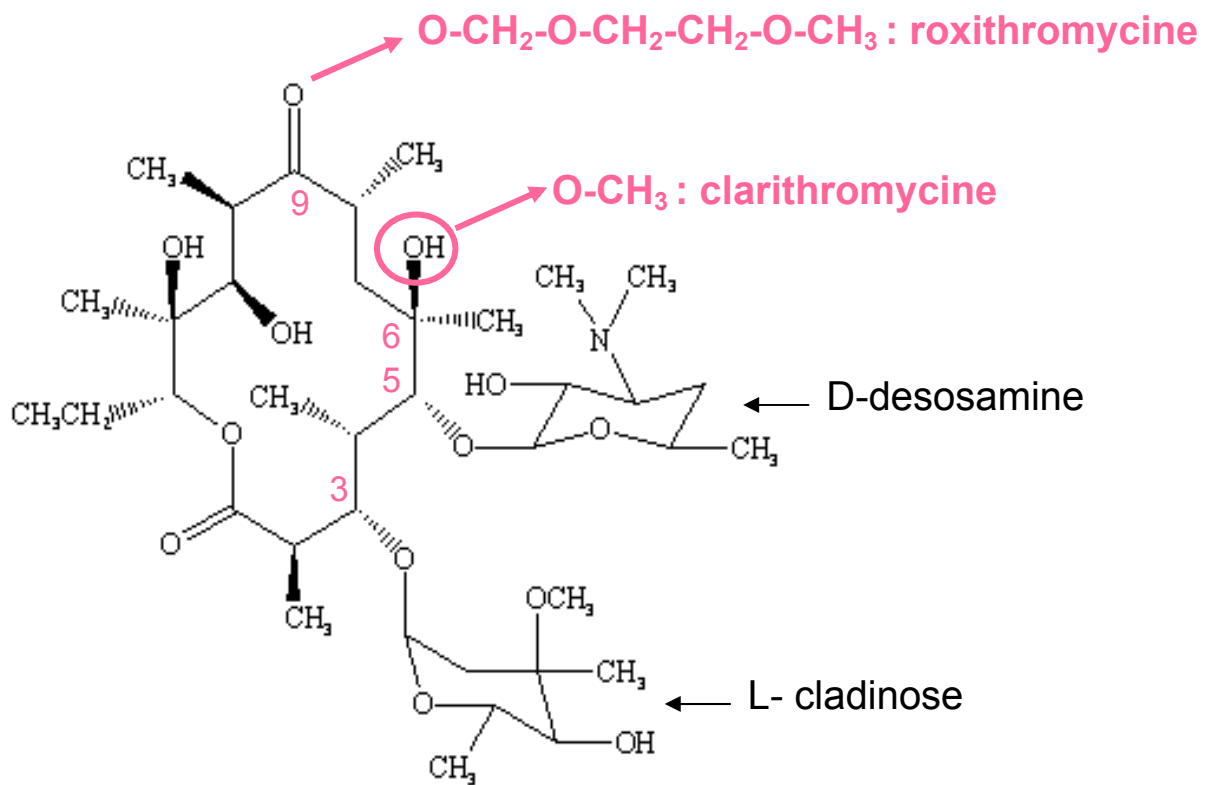
Le nom « macrolide » vient de macro (grand) et olide (lactone ou ester intracyclique). Par définition, ils possèdent un large noyau lactonique central de 12 à 16 chaînons sur lequel se greffent des sucres neutres ou aminés. Le cycle lactone est substitué par des groupements alkyles ou hydroxyles (Bryskier *et al.*, 1993).

Le chef de file de ce groupe est l'érythromycine, qui a été isolée en 1952 de culture de *Streptomyces erythraea*. Ce microorganisme produit au moins six types de molécules d'érythromycine différentes, de A à F, mais seule l'érythromycine A possède une vraie activité antimicrobienne. Elle est constituée d'un cycle lactonique à 14 atomes sur lequel sont fixés deux sucres par liaison glycosidique : un sucre neutre (L-cladinose) en position 3 et un sucre aminé (D-desosamine) en position 5 (**Figure 8**).

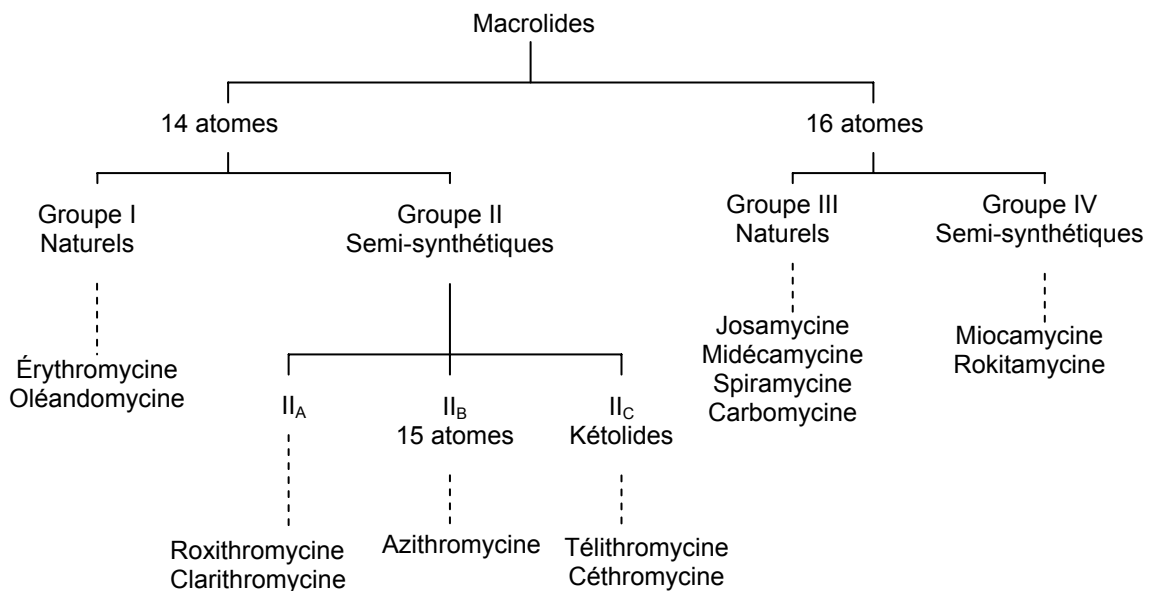
La plupart des macrolides sont produits par des espèces de *Streptomyces* et d'autres bactéries actinomycètes du sol, mais il existe également des macrolides semi-synthétiques obtenus par modification chimique des produits naturels. La classification présentée **figure 9** se base sur le nombre de chaînons de la structure lactonique et l'origine naturelle ou semi-synthétique des molécules (Bryskier *et al.*, 1993 ; Labro, 2002).

#### a) Macrolides à 14 atomes

Il existe deux macrolides à 14 atomes d'origine naturelle : l'oléandomycine, produite par *Streptomyces antibioticus*, et l'érythromycine. Cependant, l'érythromycine n'est pas parfaitement adaptée au traitement thérapeutique : insoluble dans l'eau, amère, elle est rapidement dégradée en milieu acide en métabolites bactériologiquement inactifs à l'origine de troubles gastro-intestinaux et elle présente une demi-vie d'élimination courte (2 à 4 heures)



**Figure 8.** Structure chimique de l'érythromycine A et exemples de modifications des substituants pour la synthèse de dérivés. D'après Adachi et Morimoto (2002).

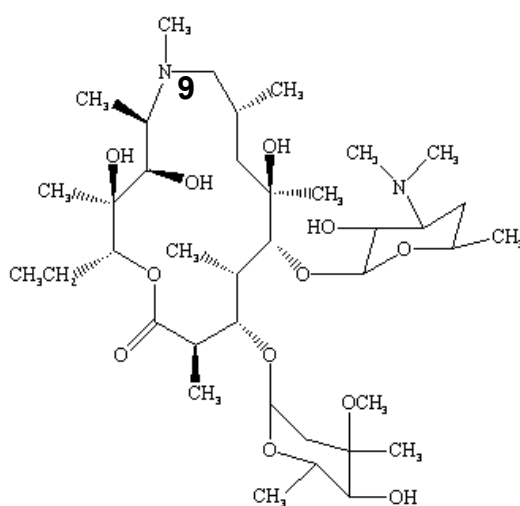


**Figure 9.** Classification des macrolides. D'après Bryskier *et al.* (1993) et Labro (2002).

(Bryskier *et al.*, 1993 ; Mattoes et Nightingale, 2002). Des dérivés semi-synthétiques ont donc été développés pour limiter ces inconvénients. Ainsi, la clarithromycine a pu être produite par le remplacement de la fonction 6-hydroxyle par une fonction 6-méthoxyle, stabilisant la molécule en milieu acide (Adachi et Morimoto, 2002). Un autre dérivé, la roxythromycine, produit du remplacement de la fonction cétone en position 9 par une fonction éther-oxyme, présente les avantages d'être à la fois stable en milieu acide, très bien assimilée par voie orale, tout en ayant une demi-vie d'élimination plus longue (12 heures) (Blondeau, 2002 ; Mattoes et Nightingale, 2002) (**Figure 8**).

### b) Macrolides à 15 atomes

Ces antibiotiques semi-synthétiques dérivent de l'érythromycine A par extension du cycle lactone, ce qui produit une molécule à 15 chaînons appelée azalide. Le chef de file de ce sous-groupe est l'azithromycine (**Figure 10**), produite par ajout d'un atome d'azote substitué par un groupement méthyle en position 9 (Schönfeld et Mutak, 2002). Cette molécule présente ainsi une grande stabilité en milieu acide, une demi-vie augmentée à plusieurs jours, une accumulation rapide dans les tissus et une pénétration améliorée dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui augmente son efficacité vis-à-vis de ces micro-organismes par rapport à l'érythromycine (Bryskier *et al.*, 1993 ; Blondeau, 2002 ; Mattoes et Nightingale, 2002).



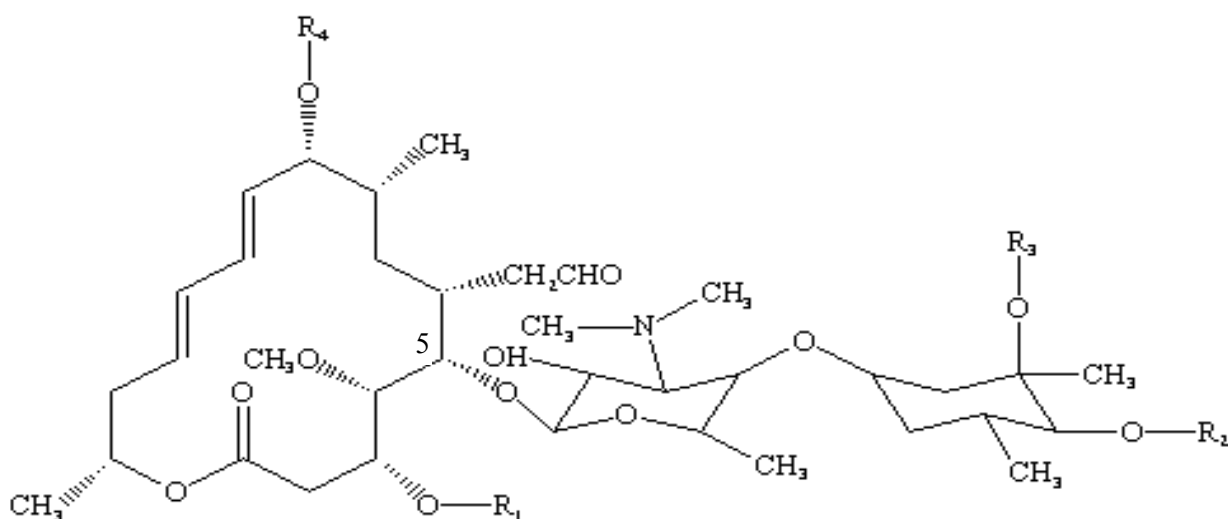
**Figure 10.** Structure chimique de l'azithromycine. D'après Schönfeld et Mutak (2002).



### c) Macrolides à 16 atomes

La josamycine, la spiramycine et la midécamycine sont des macrolides à 16 atomes d'origine naturelle produits par différentes espèces de *Streptomyces* et caractérisés par la présence d'un résidu disaccharidique en position 5 du noyau lactonique (**Figure 11**).

Des molécules semi-synthétiques telles que la miocamycine et la rokitamycine ont été obtenues à partir de ces antibiotiques naturels midécamycine A1 et leucomycine A5 (Bryskier *et al.*, 1993 ; Kirst, 2002), (**Figure 11**).

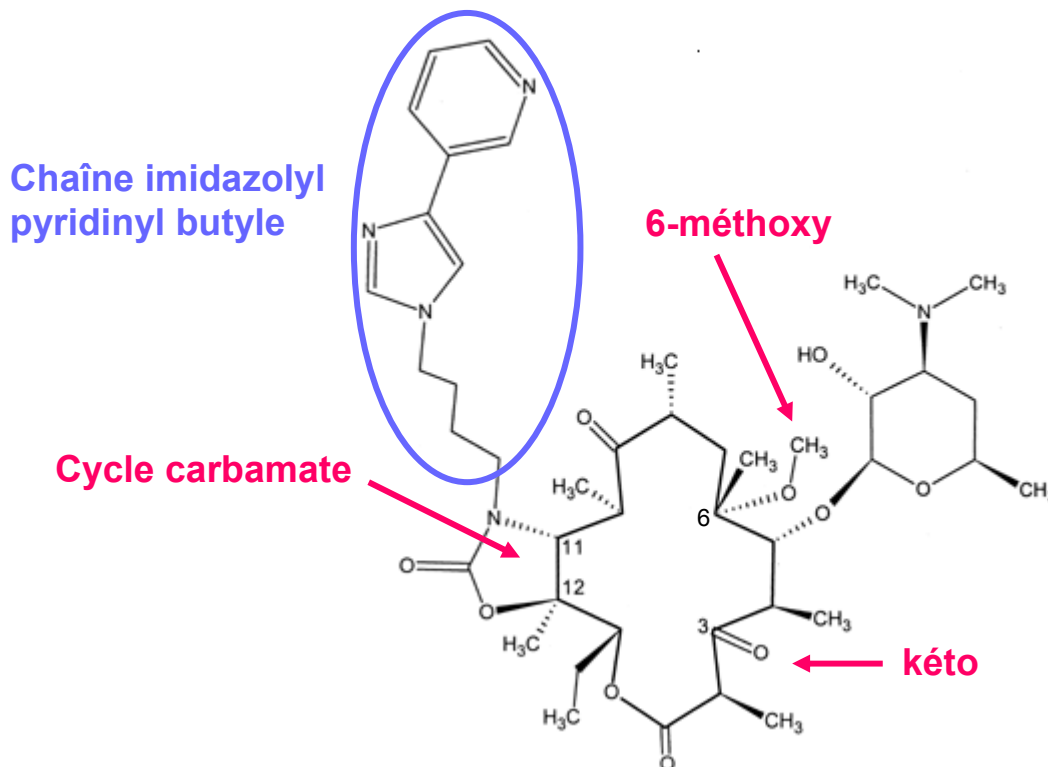


	R1	R2	R3	R4
Josamycine	CH <sub>3</sub> -CO-		H	H
Spiramycine I	H	H	H	
Midécamycine A <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	H	H
Miocamycine	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	CH <sub>3</sub> -CO-	CH <sub>3</sub> -CO-
Rokitamycine	H	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-	H

**Figure 11.** Structure chimique des macrolides à 16 atomes. D'après Kirst (2002).

## 2) Une nouvelle classe de macrolides : les kétolides

Les kétolides sont des nouveaux dérivés semi-synthétiques de l'érythromycine A formant une classe à part de macrolides à 14 atomes. Ils sont caractérisés par la présence d'une fonction cétone (kéto) en position 3 du noyau lactonique à la place du résidu L-cladinose (Bryskier et Denis, 2002). Le chef de file des kétolides est la télithromycine, commercialisée depuis 2001 sous le nom de Ketek® (Aventis) (**Figure 12**). Un autre kétolide, l'ABT 773 ou céthromycine, est en cours de développement.



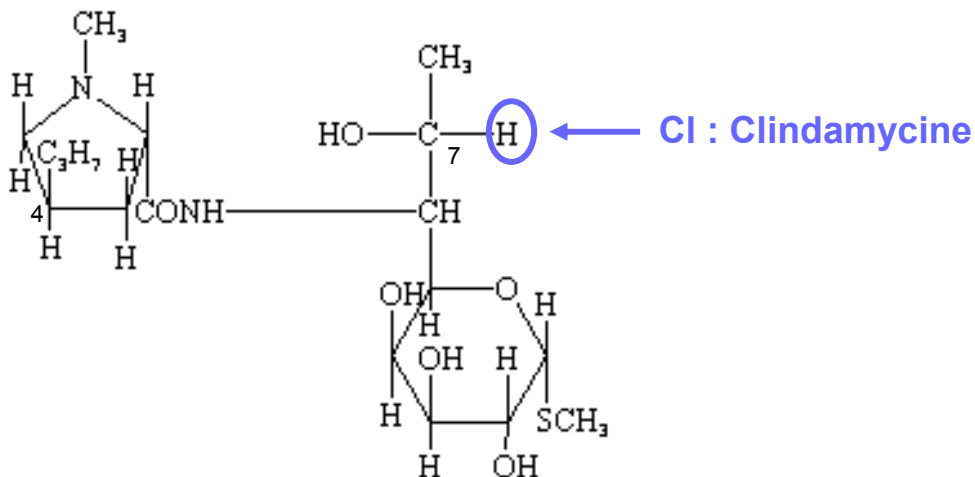
**Figure 12.** Structure chimique de la télithromycine, avec les modifications apportées à la structure chimique de l'érythromycine. D'après Bryskier et Denis (2002).

Plusieurs modifications ont été apportées à la molécule d'érythromycine A pour en améliorer les propriétés antibactériennes et pharmacocinétiques et donner naissance à la télithromycine (Zhanel *et al.*, 2002). Le sucre en position 3 a été supprimé et le résidu 3-hydroxyle a été oxydé en cétone. La suppression du sucre diminue l'activité antimicrobienne mais elle est compensée par les autres modifications et elle stabilise l'antibiotique en

empêchant l'induction de la résistance de type MLSB chez les souches portant un gène *erm* inductible (Douthwaite et Champney, 2001 ; Zhanel *et al.*, 2002 ; Bryskier et Denis, 2002 ; Clarebout et Leclercq, 2002). De plus, pour la télithromycine, un groupement méthyle a été fixé sur le groupement 6-hydroxyle pour éviter une hémikétalisation avec le nouveau groupement 3-kéto, ce qui stabilise la molécule en milieu acide. Enfin, un cycle carbamate, fixé sur les carbones 11 et 12 du noyau lactonique, augmente l'activité antimicrobienne des kétolides. Dans le cas de la télithromycine, une chaîne latérale imidazolyl pyridinyl butyle est fixée sur l'azote du carbamate. Ces structures aromatiques hétérocycliques augmentent l'affinité des molécules pour leur cible, le ribosome, ce qui améliore leur activité antimicrobienne même sur les souches résistantes à l'érythromycine (Douthwaite, 2001 ; Bryskier et Denis, 2002 ; Ackermann et Rodloff, 2003).

### 3) Les lincosamides

Les lincosamides sont constitués d'un acide aminé, la L-proline, substitué par une chaîne alkyle en position 4, et d'un sucre comportant un atome de soufre (lincosamine), reliés entre eux par une liaison amide (**Figure 13**). Le principal représentant naturel de ce groupe est la lincomycine, produite par *Streptomyces lincolnensis*. Il existe également un dérivé semi-synthétique chloré de cette molécule, la clindamycine (Bryskier, 1999a).

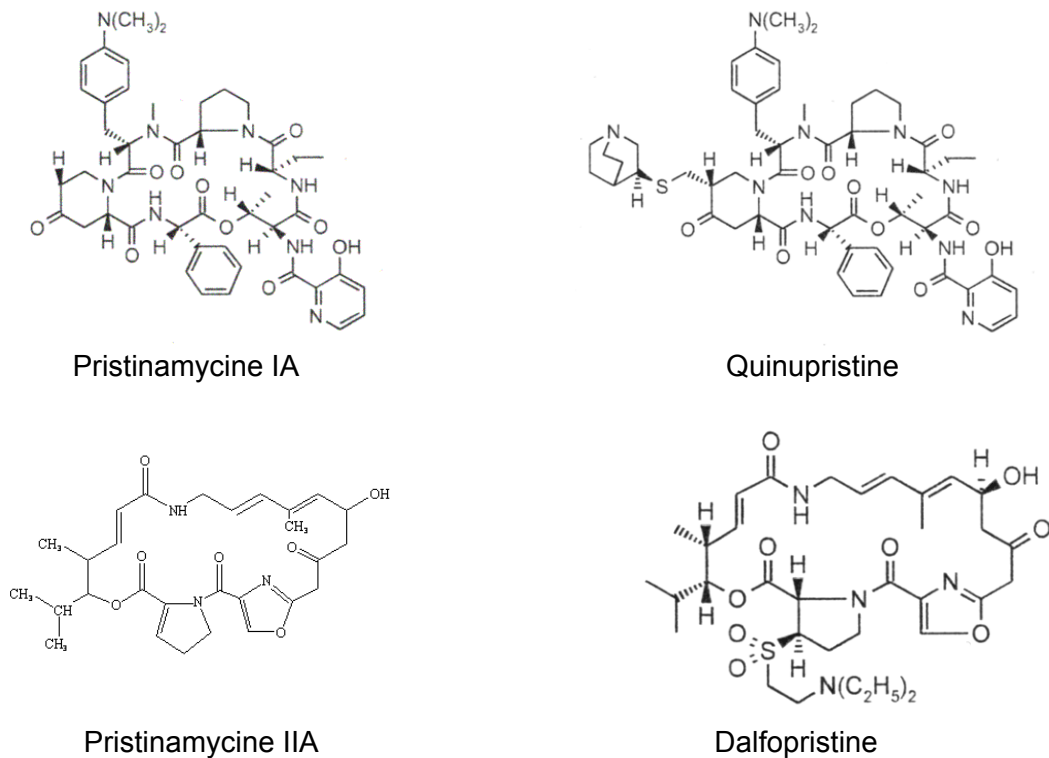


**Figure 13.** Structure chimique de la lincomycine et de la clindamycine.

#### 4) Les streptogramines

Egalement appelées synergistines, les streptogramines sont composées d'un mélange d'au moins deux types de molécules, les streptogramines A et B, agissant en synergie pour devenir parfois bactéricides alors que chacune individuellement n'est que bactériostatique. Les streptogramines A sont des macrolactones cycliques polyinsaturées alors que les streptogramines B sont des hexadepsipeptides cycliques (Bryskier, 1999b).

La pristinamycine est une streptogramine naturelle produite par *Streptomyces pristinaespiralis* (Preud'homme *et al.*, 1965). Elle est composée de 30% de pristinamycine I (streptogramine B, mélange de pristinamycine I<sub>A</sub>, I<sub>B</sub> et I<sub>C</sub>) et de 70% de pristinamycine II (streptogramine A, mélange de pristinamycine II<sub>A</sub> et II<sub>B</sub>) (**Figure 14**).



**Figure 14.** Structure chimique des streptogramines B (pristinamycine IA et quinupristine) et des streptogramines A (pristinamycine IIA et dalfopristine). D'après Canu et Leclercq (2001).

Du fait de son insolubilité dans l'eau, cet antibiotique ne peut être administré que par voie orale. Une nouvelle streptogramine hydrosoluble et injectable a donc été récemment commercialisée. Elle associe deux dérivés semi-synthétiques de la pristinamycine IA et IIA qui sont respectivement la quinupristine (streptogramine B, substitution par un

groupement quinuclidinylthiométhyle) et la dalfopriline (streptogramine A, substitution par un groupement diéthylaminoéthylsulfone) (**Figure 14**) (Bonfiglio et Furneri, 2001).

## **B. Activité anti-microbienne des MLS**

Les MLS présentent en général un effet bactériostatique et un spectre antibactérien similaire étroit orienté plutôt vers les bactéries à Gram positif, à quelques exceptions près. Ils sont inactifs sur les entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentants et la plupart des bacilles anaérobies à Gram négatif.

Les macrolides sont actifs contre les bactéries à Gram positif, les cocci à Gram négatif et certains bacilles à Gram négatif comme *H. influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio spp.*, *Helicobacter pylori* et *Legionella pneumophila*. Ils sont aussi actifs vis-à-vis d'autres bactéries comme les mycoplasmes, les chlamydiae, les rickettsies et les spirochètes. Le pourcentage actuel de résistance aux macrolides atteint ou dépasse 10% pour certaines espèces comme les entérocoques, certaines bactéries anaérobies strictes, et particulièrement pour *S. aureus* dont le taux de résistance acquis à l'érythromycine était de 39% en 1997 en Europe (Schmitz *et al.*, 1999).

Les lincosamides ont un spectre d'activité proche de celui de l'érythromycine, tout en présentant une meilleure activité contre les bactéries anaérobies mais pas d'activité sur les entérocoques, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *L. pneumophila*, *L. monocytogenes*. La lincomycine est plutôt moins active que la clindamycine (Bryskier, 1999a).

Les streptogramines ont un spectre d'action plus large et elles peuvent être bactéricides mais sont surtout utilisées contre les infections à staphylocoques : la pristnamycine est souvent active sur les souches de *S. aureus* résistantes à l'érythromycine (Bryskier, 1999b). La Qinupristine-Dalfopriline est un traitement de dernier recours dans les infections sévères à Gram positif multirésistants (*S. aureus* et *E. faecium* par exemple) (Blondeau et Sanche, 2002).

La télithromycine a été développée spécialement pour contrer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes respiratoires telles que *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *H. influenzae*. Elle présente l'avantage d'être active contre ces microorganismes même lorsqu'ils sont résistants aux macrolides (Buxbaum *et al.*, 2003). De plus, elle n'est pas capable d'induire la résistance chez les germes porteurs d'un

gène *erm* inductible (chapitre D.2, page 67) (Douthwaite et Champney, 2001 ; Ackermann et Rodloff, 2003). De manière plus générale, la télichromycine présente *in vitro* une meilleure activité que les macrolides contre les bactéries aérobies à Gram positif, mais elle est également active sur des bactéries anaérobies telles que *Clostridium spp.* et *Bacteroides spp.*, et sur les pathogènes intracellulaires tels que *Rickettsia spp.* et *Bartonella spp.* (Ackermann et Rodloff, 2003)

## C. Mode d'action des MLS

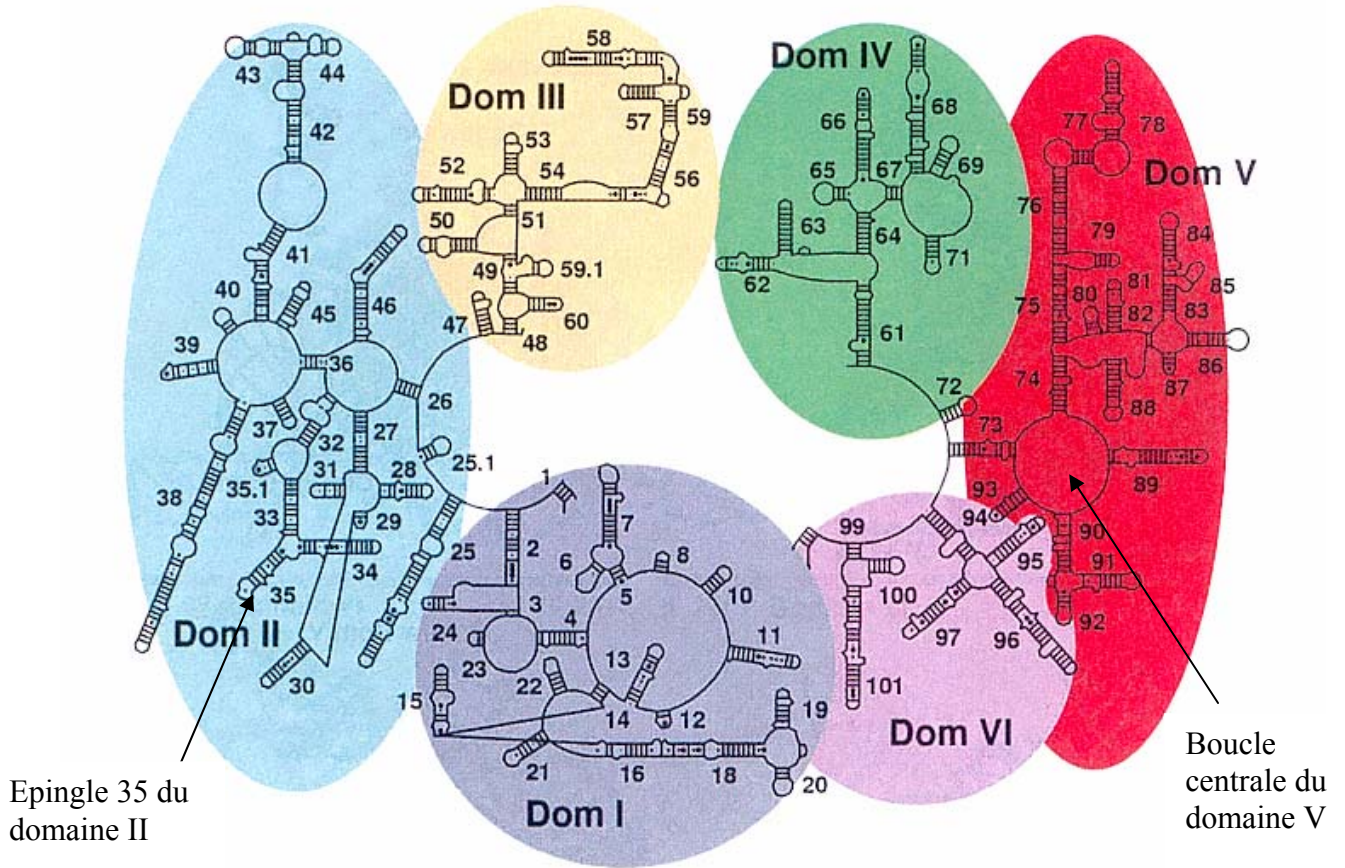
Les macrolides et apparentés inhibent la synthèse protéique par leur fixation sur la sous-unité 50S du ribosome, ce qui explique que leur effet soit surtout bactériostatique.

### 1) Le ribosome, cible des MLS

#### a) Généralités

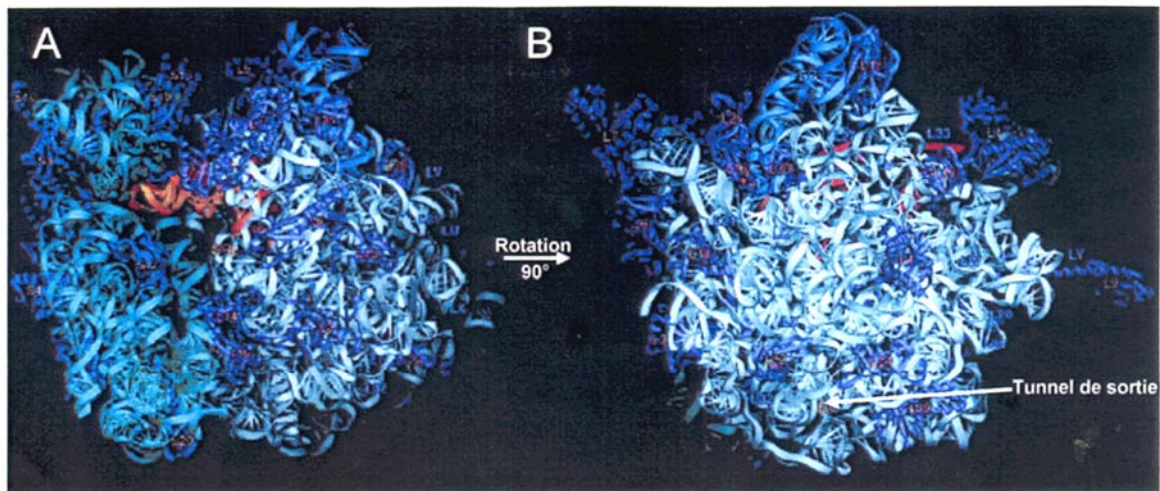
Le ribosome bactérien est constitué d'environ 2/3 d'ARN et 1/3 de protéines, qui forment en s'assemblant deux sous-unités, une petite (30S) et une grosse (50S). La petite sous-unité contient 21 protéines (S1 à S21) et l'ARNr 16S codé par le gène *rrs* d'une longueur d'environ 1500 nucléotides. La grosse sous-unité contient 36 protéines (L1 à L36), l'ARNr 23S codé par le gène *rrl* d'environ 2900 nucléotides, et l'ARNr 5S codé par le gène *rrf* d'environ 120 nucléotides. Le nombre de copies de gènes codant pour les ARNr est variable selon les espèces. *E. coli* possède ainsi 7 unités transcriptionnelles indépendantes (Asai *et al.*, 1999). Ce nombre élevé de copies de gènes codant les ARNr permettrait une forte production de ribosomes indispensable en phase exponentielle de croissance ainsi qu'une adaptation rapide aux conditions de l'environnement (Noller et van Knippenberg, 1983). D'autres espèces possèdent un grand nombre de copies de l'opéron *rrn* réunissant les gènes *rrl*, *rrf* et *rrs*, comme *B. subtilis* et *Clostridium perfringens* qui en possèdent 10. En revanche, il existe également des espèces qui ne possèdent qu'un petit nombre de copies, comme les mycoplasmes et les mycobactéries (1 ou 2 copies) (Gobel *et al.*, 1984), *H. pylori* (2 copies) (Taylor *et al.*, 1997) ou *S. pneumoniae* (4 copies) (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a). L'ensemble des protéines ribosomales est codé par des opérons répartis sur tout le chromosome bactérien. Ainsi, l'opéron S10 code pour 11 protéines ribosomales dont L4 et L22 (Worbs *et al.*, 2000).

Les ARNr se replient par appariement des bases complémentaires, adoptant ainsi leur structure secondaire. Par exemple, l'ARNr 23S est replié en 101 hélices réparties en 6 domaines catalytiques (**Figure 15**). Les ARNr et les protéines ribosomales associés forment la



**Figure 15.** Structure secondaire de l'ARNr 23S. D'après Ban *et al.* (2000).  
 Les six domaines catalytiques sont numérotés de I à VI.

structure tertiaire du ribosome, qui a récemment été modélisée par cristallographie aux rayons X pour la bactérie *Thermus thermophilus* à la résolution de 5,5 Å (**Figure 16**) (Yusupov *et al.*, 2001). Les deux sous-unités 30S et 50S ont également été modélisées séparément par la même technique (Ban *et al.*, 2000 ; Wimberly *et al.*, 2000). Ces études ont ouvert une nouvelle ère pour l'étude des mécanismes mis en œuvre par les ribosomes dans la synthèse protéique mais aussi pour l'étude des mécanismes d'interaction de ces structures avec les antibiotiques.

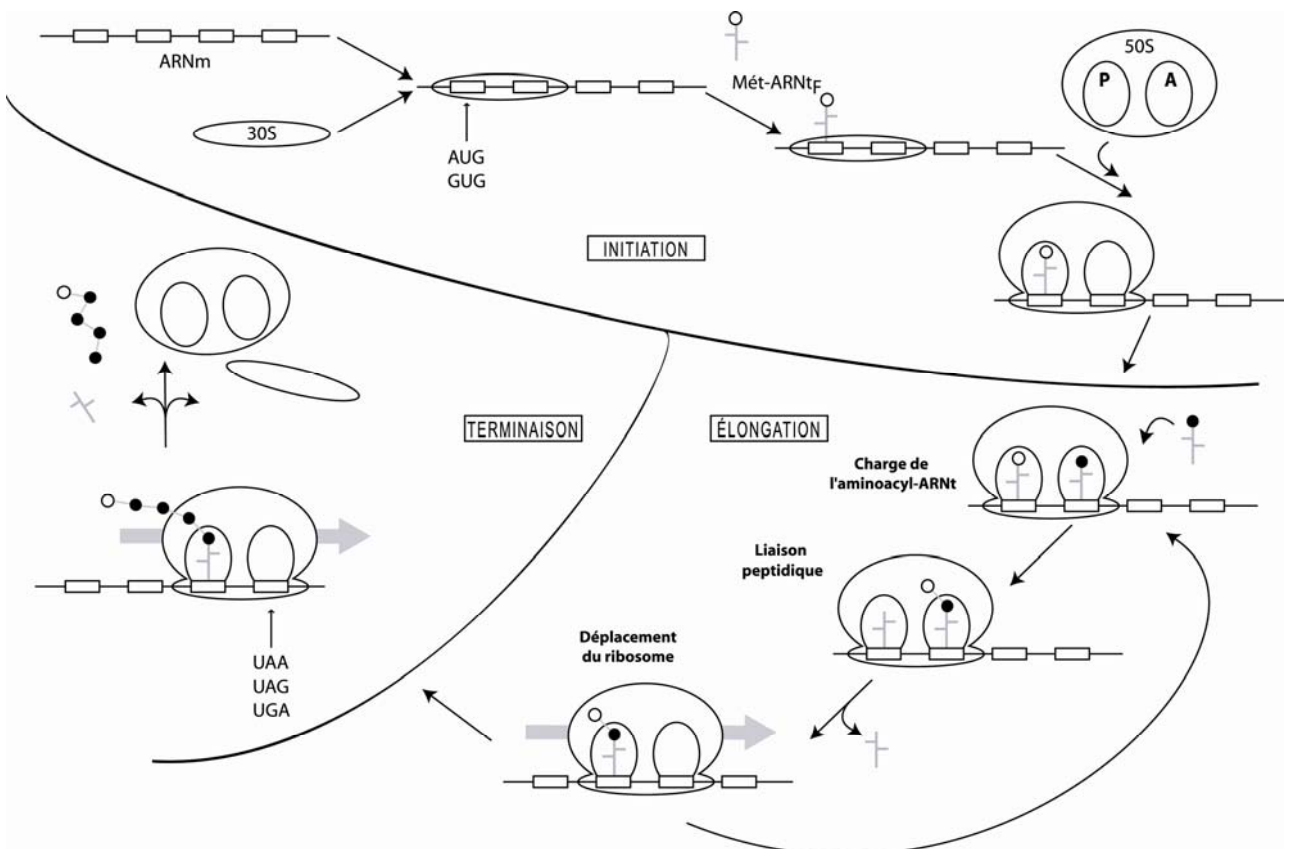


**Figure 16.** Structure du ribosome 70S de *T. thermophilus* déterminée par cristallographie aux rayons X. D'après Yusupov *et al.* (2001). **A.** Vue montrant la cavité à l'interface des deux sous-unités (30S à gauche et 50S à droite), avec un aminoacyl-ARNt positionné au site A visible en orange. **B.** Vue de l'arrière de la sous-unité 50S, montrant l'embouchure extérieure du tunnel de sortie des polypeptides.

### b) Synthèse protéique

La synthèse protéique ou traduction est la fonction du ribosome. Elle peut être réalisée grâce à l'action catalytique des ARNr, qui sont en fait des ribozymes. La **figure 17** montre les différentes étapes de ce processus. Outre le ribosome, il nécessite la participation de l'ARNm qui porte l'information génétique, des ARNt qui portent les acides aminés, et de facteurs cytoplasmiques intervenant aux différentes étapes du processus que sont l'initiation, l'élongation et la terminaison.





**Figure 17.** Les étapes de la traduction : Initiation, Elongation, Terminaison.

Au cours de l'étape d'initiation, la sous-unité 30S se fixe sur un ARNm et sur un ARNt initiateur portant un groupement formyl-méthionine. La sous-unité 50S vient compléter le tout en formant un ribosome fonctionnel dans lequel l'ARNt est situé au site peptidique (site P) de la grosse sous-unité, tandis que le site de fixation des dérivés aminoacyl-ARNt (site A) est encore vide.

Au cours de l'étape d'élongation, le ribosome se déplace le long de l'ARNm et les différents acides aminés correspondant à la séquence de celui-ci viennent se fixer au fur et à mesure sur la chaîne peptidique en formation. L'addition de chaque acide aminé nécessite trois étapes :

- attachement de l'aminoacyl-ARNt au site A,
- formation de la liaison peptidique entre le peptidyl-ARNt du site P (site donneur) et l'aminoacyl-ARNt du site A (site accepteur) grâce à l'activité peptidyl transférase du ribosome,
- translocation du ribosome le long de l'ARNm : le nouveau peptidyl-ARNt se trouve alors au niveau du site P et le site A est vide.

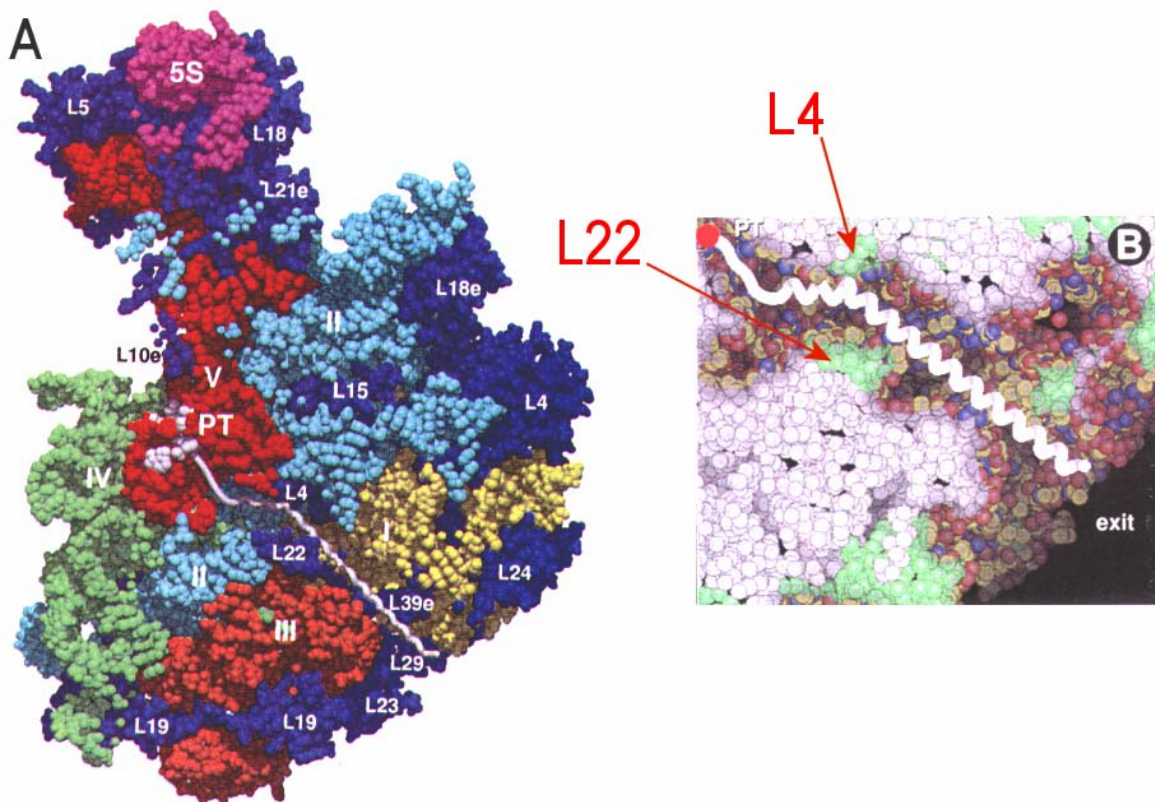
Ce cycle de trois étapes se répète pour allonger à chaque fois le peptide d'un acide aminé, jusqu'à l'étape de terminaison, où le ribosome rencontre un codon stop sur l'ARNm. Le nouveau peptide est alors libéré et les deux sous-unités du ribosome se dissocient.

### **c) Structures ribosomales impliquées dans la synthèse de la chaîne peptidique**

Le centre peptidyl transférase est aujourd'hui mieux connu grâce aux travaux récents de cristallographie de la sous-unité 50S de *Haloarcula marismortui* en présence d'analogues aux substrats des sites P et A du ribosome (Nissen *et al.*, 2000). On peut le situer sur la **figure 18 A** qui représente une coupe transversale de cette sous-unité. On voit qu'il est constitué exclusivement d'ARN, aucune protéine ne se trouvant à moins de 18 Å du centre. L'ARNr 23S est donc responsable de l'activité peptidyl transférase, en particulier au niveau de la boucle centrale du domaine V (positions 2042-2668 selon la numérotation *E. coli*), mais également au niveau de l'épingle 35 du domaine II (**Figure 15**) (Douthwaite, 1992 ; Gregory et Dahlberg, 1999b). Le nucléotide clé de la réaction catalytique semblait tout d'abord être la base A2451 : c'est le plus proche du site de formation de la liaison peptidique, il est très conservé et possède les caractéristiques physico-chimiques requises (Nissen *et al.*, 2000 ;

Thompson *et al.*, 2001). Cependant, cette hypothèse a récemment été remise en cause par plusieurs études (Beringer *et al.*, 2003 ; Youngman *et al.*, 2004).

Le peptide en croissance emprunte le tunnel de sortie du ribosome (**Figure 18**). Celui-ci commence à la base de la cavité constituant le centre peptidyl transférase, traverse la sous-unité 50S et débouche à l'arrière du ribosome (Nissen *et al.*, 2000 ; Gabashvili *et al.*, 2001). Les parois du tunnel sont essentiellement constituées des domaines I à V de l'ARNr 23S, mais quelques protéines participent également à leur formation, en particulier L4 et L22. L'entrée de ce tunnel, qui correspond aussi à la zone la plus étroite, est exclusivement constituée par les protéines ribosomales L4 et L22 (**Figure 18 B**). Celles-ci pourraient donc jouer un rôle dans le contrôle de la sortie des polypeptides naissants (Nissen *et al.*, 2000).



**Figure 18.** Structures ribosomales impliquées dans la synthèse peptidique. **A.** Coupe transversale de la sous-unité 50S du ribosome bactérien reconstituée par cristallographie. PT = Centre peptidyl transférase. **B.** Vue agrandie du tunnel de sortie des polypeptides en croissance dans le ribosome et position des protéines ribosomales L4 et L22 à l'entrée de ce tunnel. D'après Nissen *et al.* (2000)

## 2) Action des MLS sur le ribosome

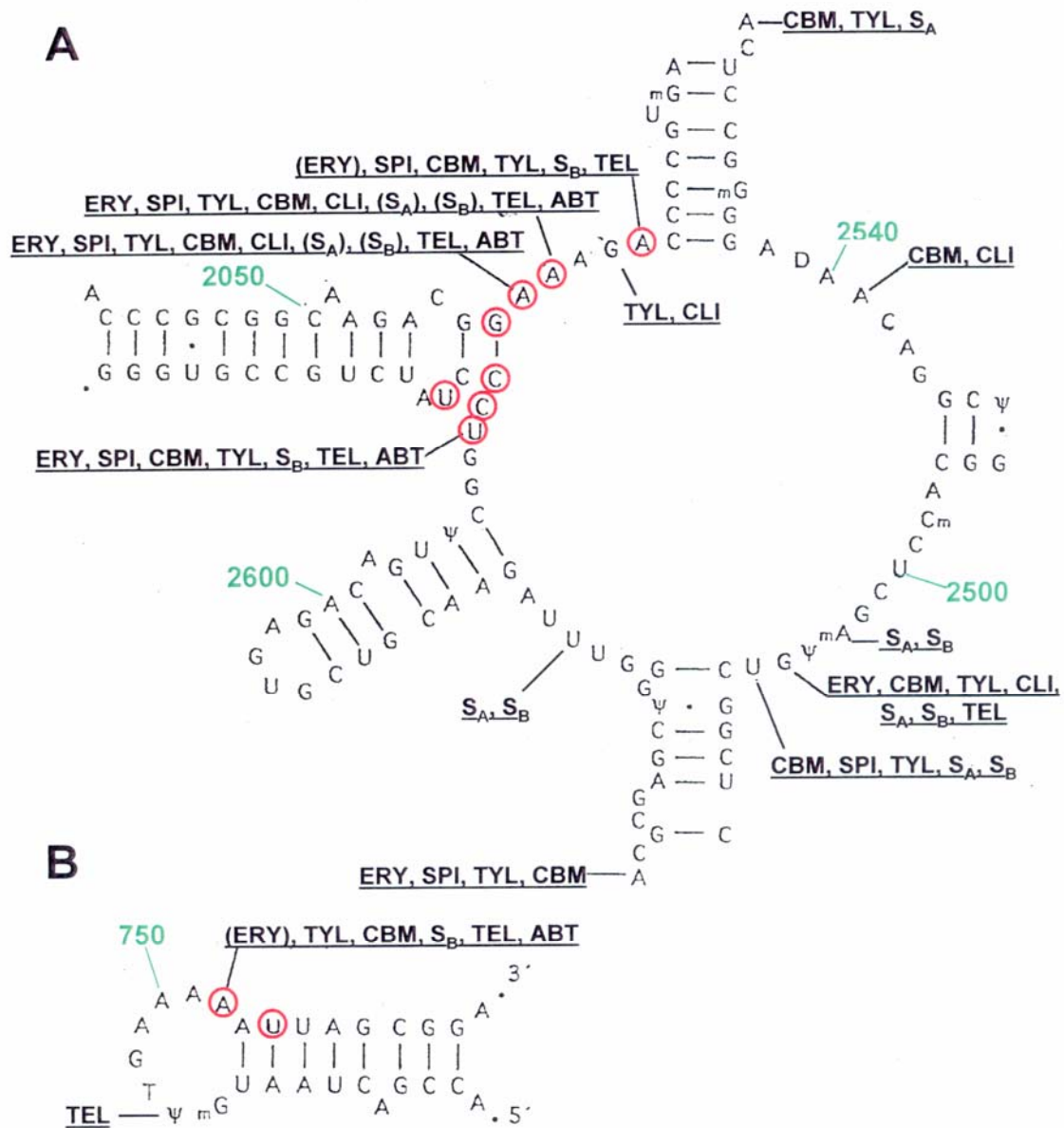
Différentes techniques sont utilisées depuis plusieurs années pour étudier les interactions entre les MLS et le ribosome, et elles ont permis la détermination de plusieurs positions clés pour cette interaction au sein de l'ARNr 23S. Ainsi, des études de fixation des MLS au ribosome (*binding*), d'empreinte chimique (*footprinting*) et l'analyse des mutations ribosomales associées à la résistance aux MLS ont fourni les premières explications concernant le site de fixation de ces antibiotiques et leur mode d'action. Les dernières études de cristallographie aux rayons X confirment maintenant ces résultats en les approfondissant.

### a) Fixation

Une interaction stoechiométrique 1:1 bloquant la synthèse protéique entre l'érythromycine et la sous-unité 50S du ribosome bactérien a été observée dès 1959 *in vivo* et *in vitro* (Brock et Brock, 1959). Cela a ensuite pu être vérifié chez les bactéries à Gram négatif (Pestka, 1974) comme chez les bactéries à Gram positif (Oleinick et Corcoran, 1969), et aussi pour d'autres macrolides comme la spiramycine. On a aussi pu observer une compétition entre les différents macrolides au niveau du site de fixation aux ribosomes, ce qui suggère que tous les macrolides interagissent avec les ribosomes à des sites communs ou identiques (Fernandez-Munoz *et al.*, 1971).

Pour ce qui est de l'interaction avec les protéines L, selon l'antibiotique testé et la nature de l'expérience (*in vivo* ou *in vitro*), des résultats contradictoires ont été obtenus (Teraoka et Nierhaus, 1978 ; Siegrist *et al.*, 1984 ; Tejedor et Ballesta, 1985). Cependant, l'interaction des macrolides avec les protéines L4 et L22 a plus récemment été établie (Chittum et Champney, 1994). D'ailleurs, des mutations des gènes codant pour ces protéines confèrent une résistance aux macrolides (Chittum et Champney, 1994 ; Gregory et Dahlberg, 1999a ; Gabashvili *et al.*, 2001).

Pour ce qui est de l'interaction avec l'ARNr, des expériences de *footprinting* ont permis de localiser le site principal de fixation des macrolides au niveau de la boucle centrale du domaine V. Tous les MLS protègent les nucléotides A2058 et A2059 des modifications chimiques (Moazed et Noller, 1987 ; Douthwaite, 1992 ; Douthwaite et Aagaard, 1993 ; Hansen *et al.*, 1999 ; Porse et Garrett, 1999 ; Garza-Ramos *et al.*, 2001 ; Vester et Douthwaite, 2001), mais d'autres nucléotides peuvent également être impliqués, comme ceux qui se trouvent aux positions 2061, 2062, 2439, 2451, 2503, 2505, 2506, 2585 et 2609 (**Figure 19**).

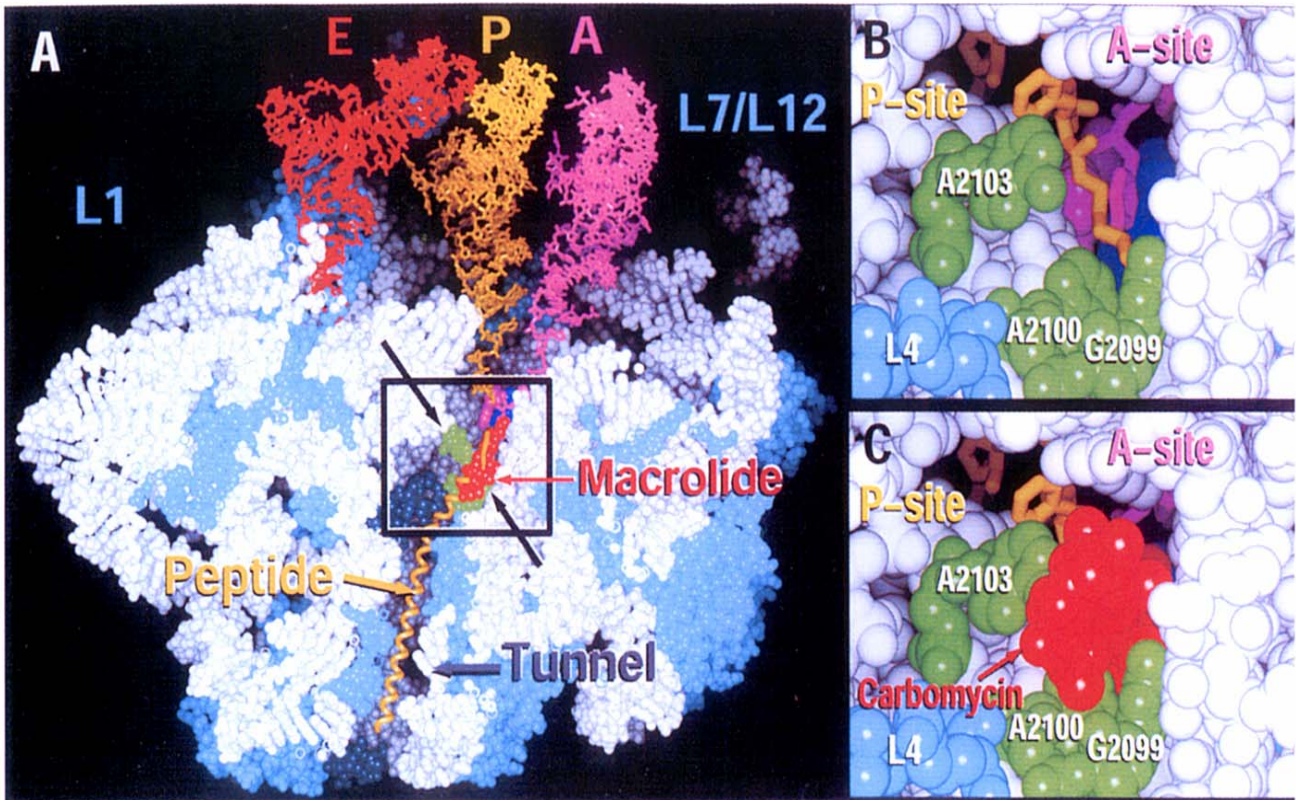


**Figure 19.** Nucléotides de l'ARNr 23S impliqués dans l'interaction MLS-ribosome identifiés par les expériences de *footprinting*. **A.** Boucle centrale du domaine V. **B.** Tige 35 du domaine II. Les antibiotiques indiqués entre parenthèses augmentent la réactivité du nucléotide et les autres les protègent des modifications chimiques. Les nucléotides entourés en rouge, lorsqu'ils sont mutés, provoquent une résistance aux MLS. En vert est indiquée la numérotation de *E. coli*. D'après Pereyre (2003).

Cependant, ces sites de fixation sont chevauchants mais pas identiques selon les molécules, puisqu'il existe des spécificités, avec par exemple le nucléotide A2609 impliqué uniquement dans l'interaction avec les kétolides (Garza-Ramos *et al.*, 2001), ou le nucléotide A2062 responsable, quand il est muté, d'une résistance spécifique aux lincosamides (Furneri *et al.*, 2001). Le domaine II de l'ARNr 23S participe également à l'interaction MLS-ribosome au niveau de sa tige 35 (**Figures 15 et 19**), en particulier le nucléotide A752 (Moazed et Noller, 1987 ; Hansen *et al.*, 1999).

Les kétolides présentent la particularité de se fixer au ribosome avec une affinité beaucoup plus grande que l'érythromycine (de l'ordre de 10 fois plus) (Hansen *et al.*, 1999), même lorsque le site A2058 est muté (affinité multipliée par 20 dans ce cas). Ceci pourrait être dû à une interaction supplémentaire que la télithromycine développe avec le domaine II de l'ARNr 23S (Douthwaite *et al.*, 2000 ; Douthwaite et Champney, 2001), bien qu'une étude récente démontre que la mutation des bases impliquées dans cette interaction ne confère pas un niveau de résistance significatif aux kétolides (Novotny *et al.*, 2004).

Les données de cristallographie aux rayons X réalisée sur des sous-unités 50S complexées à différents MLS ont permis de confirmer ces résultats tout en affinant les connaissances concernant les interactions physico-chimiques entre les molécules (Hansen *et al.*, 2002 ; Berisio *et al.*, 2003 ; Schlunzen *et al.*, 2003). Elles confirment que les interactions se situent à proximité du centre peptidyl transférase, à l'entrée du tunnel par lequel les polypeptides en croissance quittent le ribosome (**Figure 20**). Elles ont, par exemple, permis de voir qu'il n'y a pas d'interactions directes entre l'érythromycine et les protéines ribosomales L4 et L22. La résistance à ce macrolide causée par des mutations dans ces structures ne seraient donc qu'une conséquence indirecte d'une modification globale de la structure tridimensionnelle du ribosome (Gregory et Dahlberg, 1999a ; Davydova *et al.*, 2002). Par contre, d'autres macrolides comme l'azithromycine et la tylosine présenteraient des interactions directes avec ces protéines, sans pour autant qu'une réelle fixation entre les deux partenaires ne soit observée (Hansen *et al.*, 2002 ; Schlunzen *et al.*, 2003).



**Figure 20.** Vue générale du site de fixation des macrolides montrant comment ils bloquent le tunnel de sortie des polypeptides chez *H. marismortui*. D'après Hansen *et al.* (2002). **A.** Vue de la sous-unité 50S par son interface avec la sous-unité 30S, permettant de visualiser le tunnel de sortie et un polypeptide en croissance (en jaune). En blanc est représenté l'ARNr et en bleu les protéines ribosomales. En rouge, orange et rose sont représentés les ARNt aux trois sites A, P et E (site de sortie du ribosome). Les flèches noires indiquent une ouverture entre le centre peptidyl transférase et le tunnel où les macrolides (en rouge) se fixent. En vert sont représentés les atomes constituant les bases interagissant avec le macrolide. **B.** Vue alternative du tunnel à travers le goulot d'étranglement, montrant les substrats des sites A (en rose) et P (en orange) fixés au site actif du centre peptidyl transférase. **C.** L'ouverture représentée en (B) est bouchée à la fois par la fixation du macrolide (en rouge) et par le changement de conformation du nucléotide A2103 (correspondant à la position 2062 de *E. coli*).

## **b) Effets sur la synthèse protéique**

Le mécanisme exact d'inhibition de la traduction reste encore mal connu. On sait que l'érythromycine n'inhibe pas l'activité peptidyl transférase, contrairement aux lincosamides et aux macrolides à 16 atomes, mais qu'elle empêche l'élongation de la chaîne peptidique en obstruant le tunnel de sortie du ribosome. En effet, elle n'est pas active sur les ribosomes pendant le processus d'élongation protéique : le tunnel étant occupé par le polypeptide en croissance, la cible n'est plus accessible. La synthèse des très courts peptides n'est pas non plus inhibée par cet antibiotique puisque 5 à 7 acides aminés sont nécessaires pour que la chaîne peptidique atteigne l'entrée du tunnel où est situé le macrolide (Allen, 2002 ; Tenson *et al.*, 2003).

Les macrolides inhiberaient donc l'étape de translocation et provoqueraient la dissociation prématurée du peptidyl-ARNt en cours de synthèse (Menninger, 1995). Le blocage de la chaîne naissante à l'entrée du tunnel déstabiliserait la liaison de ce dernier au site P.

D'autre part, un effet sur l'assemblage des ribosomes a été mis en évidence pour certains MLS. Ainsi, l'érythromycine et l'azithromycine empêchent la sous-unité 50S de se former chez *E. coli* et *S. aureus*. Chez ce dernier, le même effet est observé avec les autres MLS, ce qui n'est pas le cas pour *E. coli* (Chittum et Champney, 1995 ; Champney *et al.*, 1998 ; Champney et Tober, 2000). Selon les molécules et les bactéries, l'effet inhibiteur de la synthèse protéique peut être prépondérant ou bien équivalent à l'effet inhibiteur de l'assemblage des deux sous-unités.

Enfin, les streptogramines présentent la particularité d'agir en synergie : les streptogramines B n'inhibent pas l'activité peptidyl transférase, avec un mécanisme d'action et des sites de fixation similaires aux macrolides à 14 et 15 atomes, tandis que les streptogramines A inhibent l'étape d'élongation en bloquant la fixation des substrats aux sites A et P du ribosome (Vannuffel et Cocito, 1996). Une étude récente a permis d'élucider le mécanisme de la synergie entre les deux composés : ils interagissent directement l'un avec l'autre en partageant un contact avec le nucléotide A2062, et leur fixation provoque un changement de conformation de 180° du nucléotide U2585, ce qui provoquerait l'effet bactéricide de l'association (Harms *et al.*, 2004).



## D. La résistance aux MLS

La plupart des bacilles à Gram négatif possèdent une résistance intrinsèque aux MLS, dont on a longtemps pensé qu'elle était due à une imperméabilité naturelle de la membrane externe à ces antibiotiques hydrophobes (Leclercq et Courvalin, 1991), avant que des travaux plus récents n'identifient des pompes d'efflux chez *E. coli*, comme la pompe AcrAB (Nikaido, 1996). Parmi les bactéries pathogènes naturellement sensibles à ces antibiotiques, différents types de résistances se sont développés, pouvant conférer des phénotypes typiques selon le mécanisme impliqué. Ainsi, pour ce qui est de la résistance aux macrolides, on trouve aujourd'hui des souches résistantes uniquement à ces antibiotiques (phénotype M), des souches présentant une résistance croisée aux macrolides et aux streptogramines B (phénotype MS<sub>B</sub>), ou aux macrolides et aux lincosamides (phénotype ML) et enfin des souches résistantes à la fois aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines B (phénotype MLS<sub>B</sub>). Ces phénotypes reposent sur des mécanismes divers tels que la modification de la cible, l'efflux actif ou encore l'inactivation enzymatique de l'antibiotique. Nous décrivons ici les mécanismes relevés chez le staphylocoque doré, objet de notre étude, avant de détailler plus particulièrement le mécanisme de résistance par mutation de la cible retrouvé chez de nombreuses autres espèces.

### 1) Mécanismes de résistance décrits chez *S. aureus*

#### a) Efflux actif

Le gène *msr(A)*, décrit d'abord chez *Staphylococcus epidermidis*, confère une résistance de type MS<sub>B</sub> (Ross *et al.*, 1990). On le retrouve maintenant également chez *S. aureus* (Wondrack *et al.*, 1996 ; Matsuoka *et al.*, 2003). La protéine Msr(A) est spécifique des macrolides à 14 et 15 atomes et des streptogramines B et elle présente des homologies avec les ABC transporteurs. Cependant, contrairement aux autres membres de cette famille, elle ne possède pas de domaine transmembranaire. Le gène *msr(A)* cloné chez *S. aureus* conférant à lui seul la résistance, on pense que la protéine utilise un partenaire codé par un ou des gènes chromosomiques lui permettant d'excréter les antibiotiques, mais celui-ci n'est pas identifié à ce jour (Ross *et al.*, 1990 ; Ross *et al.*, 1995 ; Ross *et al.*, 1996). D'autre part, le rôle direct de la protéine Msr(A) dans l'efflux des MS<sub>B</sub> est aujourd'hui mis en doute : la protéine pourrait en fait ne pas être un ABC transporteur mais un protecteur du ribosome qui entraînerait un changement de conformation du site de fixation ribosomal des antibiotiques occasionnant une dissociation entre le macrolide et le ribosome (Reynolds *et al.*, 2003). Ce mécanisme de

résistance reste assez peu répandu chez cette espèce, puisque une étude réalisée en France rapportait que seules 2,1% de 144 souches contenaient le gène *msr(A)* (Lina *et al.*, 1999).

Par ailleurs, des gènes spécifiques de la résistance aux streptogramines A, *vga(A)*, *vga(Av)* et *vga(B)*, codant les protéines d'efflux Vga(A), Vga(Av) et Vga(B), ont été détectés chez *S. aureus*, mais ceux-ci n'empêchent pas l'activité synergique de l'association streptogramines A et B (Allignet *et al.*, 1992 ; Allignet et El Solh, 1997).

### **b) Modification enzymatique**

En général, ce mécanisme confère une résistance isolée à l'antibiotique concerné puisque l'enzyme reconnaît spécifiquement sa structure chimique. Chez *S. aureus*, il est encore très peu répandu et seuls quelques exemples sont cités dans la littérature. Ainsi, le gène *ere(B)* codant pour une estérase spécifique des macrolides à 14 et 16 atomes a été détecté chez seulement 0,6% des souches résistantes à ce macrolide parmi une population collectée dans 24 hôpitaux européens (Schmitz *et al.*, 2000b). D'autre part, quelques souches cliniques portant le gène *mph(C)* codant pour une phosphotransférase des macrolides ont été décrites (Matsuoka *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1999). Toutefois, il semble que la présence de *msr(A)* à proximité soit indispensable à l'expression de la résistance conférée par ce gène (Matsuoka *et al.*, 2003). Il existe également quelques cas de souches possédant une nucléotidyl transférase spécifique des lincosamides de type *lnu(A)* (Brisson-Noel *et al.*, 1988). Enfin, il existe des gènes responsables de l'inactivation des streptogramines. *Vgb(A)* et (B) correspondent à des hydrolases spécifiques des streptogramines B, tandis que *Vat(A)*, (B) et (C) sont des acétyltransférases spécifiques des streptogramines A (Roberts *et al.*, 1999). Les gènes *vat(A)* et *vgb(A)* sont cependant souvent associés aux gènes *vga(A)*, (Av) et (B), codant pour les protéines d'efflux, et dans ce cas, on ne peut pas évaluer la part de chacun des déterminants dans la résistance (Allignet *et al.*, 1996).

### **c) Modification de la cible par méthylation de l'ARNr 23S**

Le mécanisme de résistance le plus répandu chez *S. aureus* correspond à une méthylation de l'adénosine 2058 du domaine V de l'ARNr 23S, très conservé chez toutes les espèces bactériennes. Comme nous le précisons au chapitre C.2.a, page 59, ce nucléotide se situe au cœur du centre peptidyl transférase, cible des MLS, et il est essentiel pour leur fixation sur le ribosome. Sa modification confère donc à la souche un phénotype MLS<sub>B</sub> du fait du chevauchement des sites de fixation de ces antibiotiques (Sutcliffe et Leclercq, 2002).

Ce phénotype est en fait très répandu chez de nombreuses espèces bactériennes, et il est dû à l'acquisition d'un gène *erm* codant pour une méthylase. A ce jour, plus de 40 gènes *erm* ont été décrits chez des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et chez les organismes producteurs de macrolides (Vester et Douthwaite, 2001 ; Sutcliffe et Leclercq, 2002). Il existe des mono- et des diméthyl transférases qui conduisent respectivement aux phénotypes de résistance MLS I et MLS II (Pernodet *et al.*, 1996). Le phénotype MLS I, codé par les gènes *erm* de type I, correspond à une forte résistance aux lincosamides avec une résistance intermédiaire à certains macrolides comme la spiramycine (macrolide à 16 atomes), et une résistance limitée à la tylosine (macrolide à 16 atomes à usage vétérinaire). Le phénotype MLS II, en revanche, confère une résistance de haut niveau à tous les MLSB (Sutcliffe et Leclercq, 2002). Chez les bactéries pathogènes, les gènes sont essentiellement portés par des transposons. Dans le cas de *S. aureus*, les gènes *erm(A)* et *erm(C)* sont les plus fréquemment retrouvés (Schmitz *et al.*, 2000a ; Schmitz *et al.*, 2000b ; Spiliopoulou *et al.*, 2004), tandis qu'il n'existe que quelques exemples de souches contenant le gène *erm(B)* (Schmitz *et al.*, 2000a ; Bozdogan *et al.*, 2003) et qu'un nouveau gène, *erm(Y)* a récemment été détecté chez une souche clinique (Matsuoka *et al.*, 2002).

L'expression des gènes *erm* peut être constitutive ou inductible. Dans le cas d'une résistance constitutive, l'ARNm du gène est synthétisé sous sa forme active et sa traduction permet la méthylation des ribosomes. C'est le mode de résistance le plus répandu chez les staphylocoques. Dans le cas d'une résistance inductible, l'ARNm est synthétisé sous une forme inactive qui peut être activée en présence d'un inducteur. Le mécanisme le plus étudié est celui de l'induction de l'expression du gène *erm(C)* de staphylocoque. Les souches sont résistantes aux macrolides à 14 et 15 atomes qui sont inducteurs. Par contre, les macrolides à 16 atomes, les lincosamides et les streptogramines B, non inducteurs, restent actifs (Sutcliffe et Leclercq, 2002). Le mécanisme d'induction correspond en fait à une atténuation traductionnelle : l'ARNm est bien synthétisé mais il se replie au niveau du site d'initiation de la traduction par appariement de bases complémentaires. L'induction se fait grâce à la présence d'un gène codant pour un petit peptide en amont de *erm(C)*, sur le même ARNm : en présence d'inducteur, la traduction du petit peptide est bloquée, ce qui modifie la conformation de l'ARNm dans son ensemble et rend la séquence d'initiation de la traduction de *erm(C)* accessible (Sutcliffe et Leclercq, 2002). Ce type de mécanisme serait également impliqué dans la régulation de l'expression d'autres gènes *erm* comme *erm(A)*, (B) et (G),

mais il existerait également pour *erm*(B) des possibilités d'atténuation transcriptionnelle, comme pour *erm*(K) (Kwak *et al.*, 1991).

Les kétolides présentent la particularité de n'être pas inducteurs de l'expression des gènes *erm* (chapitre A.2, page 49). Il faut noter également qu'une résistance constitutive ou même inductible mais avec un profil inhabituel peut être due à des altérations de l'atténuateur (Schmitz *et al.*, 2001 ; Clarebout *et al.*, 2001 ; Schmitz *et al.*, 2002).

## 2) Mécanismes de résistance par mutation de la cible

Chez les souches cliniques de *S. aureus* étudiées jusqu'ici, la résistance a toujours été décrite comme étant due à des mécanismes « épidémiques », acquis par l'intégration de gènes plasmidiques ou transposables (Lina *et al.*, 1999). Des mutants de la cible ribosomale résistants aux MLS ont été décrits, d'abord *in vitro* puis chez des souches cliniques, mais pas chez *S. aureus*. Trois structures sont concernées par les mutations décrites à ce jour : l'ARNr 23S et les deux protéines ribosomales L4 et L22, aussi bien chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif (Weisblum, 1995).

### a) Mutations dans l'ARNr 23S

Le **tableau 1** répertorie les mutations de cette structure associées à des résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes, et les positions de l'ARNr 23S concernées par le phénomène sont représentées **figure 19**. Les mutations répertoriées à ce jour sont situées majoritairement dans le domaine V et plus rarement dans le domaine II de l'ARNr 23S. Il existe cependant deux exemples de mutations situées en dehors de ces structures : une souche de *S. pneumoniae* obtenue *in vitro* présentant une mutation du domaine III (Sutcliffe *et al.*, 2000) et une série de souches cliniques d'*H. pylori* présentant une mutation dans le domaine VI (Fontana *et al.*, 2002).

#### ◆ Domaine V

La plupart du temps, le nucléotide concerné est l'adénine 2058 du domaine V, ou les positions voisines 2057 et 2059. Ces mutations ont été décrites aussi bien chez des mutants sélectionnés *in vitro* que chez des souches cliniques résistantes isolées chez des patients traités avec des MLS. Les mutations de la base 2611 sont également répandues chez les souches résistantes, mais d'autres positions également situées dans la boucle centrale de l'ARNr 23S, au cœur du centre peptidyl transférase, ont été décrites, comme les bases 2062, 2609, 2610 et 2613 appartenant au site de fixation des MLS au ribosome (**Figure 19, Tableau 1**).

**Tableau 1.** Mutations de l'ARNr 23S associées à des résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes. D'après Pereyre (2003).

Position <sup>a</sup>	Bactérie	Isolement <sup>b</sup>	Mutation <sup>c</sup>	Phénotype <sup>d</sup>	Références
752	<i>S. pneumoniae</i>	L	Délétion A752	M14, M15, Tel	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
754	<i>E. coli</i>	L	U754A	Ery <sup>BN</sup> , Tel <sup>BN</sup>	(Xiong <i>et al.</i> , 1999)
2032	<i>E. coli</i>	L	G2032A	Cli	(Douthwaite, 1992)
2057	<i>E. coli</i>	L	G2057A	M14	(Ettayebi <i>et al.</i> , 1985)
	<i>Propionibacterium acnes</i>	C	G2057A	Ery <sup>BN</sup>	(Ross <i>et al.</i> , 1997)
2057+	<i>E. coli</i>	L	G2057A +G2032A	Ery, Cli	(Douthwaite, 1992)
2032	<i>H. pylori</i>	C	G2057A(1) + A2032G(1)	M14, M15	(Hulten <i>et al.</i> , 1997)
2058	<i>B. pertussis</i>	C	A2058G	M14, M15	(Bartkus <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	C	A2058C	Ery, Azi, Jos	(Misyurina <i>et al.</i> , 2004)
	<i>H. influenzae</i>	L	A2058G	M14, M15, Cli	(Clark <i>et al.</i> , 2002)
		C	A2058G	Clr, Azi	(Peric <i>et al.</i> , 2003)
	<i>H. pylori</i>	L	A2058G/C/U	Clr	(Wang et Taylor, 1998)
		C	A2058G(1)	Clr	(Versalovic <i>et al.</i> , 1996)
		C	A2058G(2)	MLS <sub>B</sub>	(Versalovic <i>et al.</i> , 1996 ; Hulten <i>et al.</i> , 1997 ; Occhialini <i>et al.</i> , 1997 ; Wang et Taylor, 1998)
		C	A2058C	ML	(Occhialini <i>et al.</i> , 1997 ; Vester et Douthwaite, 2001)
	<i>Mycobacterium abcessus</i>	C	A2058G	Clr	(Wallace, Jr. <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Mycobacterium avium</i>	C	A2058G/C/U	Clr	(Jamal <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Mycobacterium chelonae</i>	C	A2058C/G	Clr	(Wallace, Jr. <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	C	A2058G/C/U	Clr	(Meier <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Mycobacterium kansasii</i>	C	A2058U	Clr, Azi	(Burman <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	L	A2058G(1)	Clr	(Sander <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	L	A2058G	ML	(Lucier <i>et al.</i> , 1995 ; Okazaki <i>et al.</i> , 2001)
		C	A2058G	ML	(Ross <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Propionibacterium spp.</i>	C, L	A2058G	MLS <sub>B</sub>	(Nagai <i>et al.</i> , 2000 ; Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)
	<i>S. pneumoniae</i>	L	A2058G(2)	MLS <sub>B</sub>	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
			A2058G(3)	ML, Tel <sup>BN</sup>	
			A2058U(3)	ML, Tel <sup>BN</sup>	(Farrell <i>et al.</i> , 2003)
		C	A2058G(2 ou 3)	MLS <sub>B</sub>	
			A2058G(4)	ML, Tel <sup>BN</sup>	(Butler <i>et al.</i> , 2003)
			A2058U(2)	MLS <sub>B</sub>	(Farrell <i>et al.</i> , 2004)
			A2058U(3) + L4	ML	(Reinert <i>et al.</i> , 2004)
			A2058G + L4	cMLS <sub>B</sub>	(Jalava <i>et al.</i> , 2004)
	<i>S. pyogenes</i>	C	A2058G(4)	Ery, Cli, Tel	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Treponema denticola</i>	L	A2058G(1, 2)	Ery	(Stamm et Bergen, 2000)
	<i>Treponema palladium</i>	C	A2058G(2)	M14, M15	
2059	<i>H. influenzae</i>	L	A2059C	M14, M15, Cli	(Clark <i>et al.</i> , 2002)
	<i>H. pylori</i>	L	A2059G/C	Clr	(Wang et Taylor, 1998)
		C	A2059G	ML	(Versalovic <i>et al.</i> , 1996 ; Hulten <i>et al.</i> , 1997 ; Occhialini <i>et al.</i> , 1997 ; Wang et Taylor, 1998)
					(Jamal <i>et al.</i> , 2000)
	<i>M. avium</i>	C	A2059G/C	Clr, Azi	(Wallace, Jr. <i>et al.</i> , 1996)
	<i>M. abcessus</i>	C	A2059G/C	Clr	(Wallace, Jr. <i>et al.</i> , 1996)
	<i>M. chelonae</i>	C	A2059G	Clr	(Jamal <i>et al.</i> , 2000 ; Vester et Douthwaite, 2001)
	<i>M. intracellulare</i>	C	A2059G/C	Clr, Azi	(Sander <i>et al.</i> , 1997)
					(Pereyre <i>et al.</i> , 2002)
	<i>M. smegmatis</i>	L	A2059G(1)	Clr	
	<i>Mycoplasma hominis</i>	C	A2059G	ML, Tel	(Lucier <i>et al.</i> , 1995 ; Okazaki <i>et al.</i> , 2001)
	<i>M. pneumoniae</i>	L	A2059G/C	ML	(Ross <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Propionibacterium spp.</i>	C	A2059G	ML	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)
	<i>S. pneumoniae</i>	L	A2059G(2)	ML	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000b)
			A2059G(3)	ML	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
			A2059G(4)	ML	(Pihlajamaki <i>et al.</i> , 2002)
		C	A2059G(2)	ML	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)

Position <sup>a</sup>	Bactérie	Isolement <sup>b</sup>	Mutation <sup>c</sup>	Phénotype <sup>d</sup>	Références
2059	<i>S. pneumoniae</i>	C	A2059G(3) A2059G(1 à 4) A2059G(4) + L22 A2059C(4) + L4 A2059C(2 à 4) A2059G + L4	ML MLS <sub>B</sub> MLS <sub>B</sub> ML ML iMLS <sub>B</sub>	(Farrell <i>et al.</i> , 2003)  (Farrell <i>et al.</i> , 2004) (Pihlajamaki <i>et al.</i> , 2002) (Reinert <i>et al.</i> , 2004)
2057 +2059	<i>S. pneumoniae</i>	C	G2057A + A2059G	ML	(Farrell <i>et al.</i> , 2004)
2062	<i>M. hominis</i>	L	A2062G(1)	M16	(Furneri <i>et al.</i> , 2001)
		L	A2062U(2)	M16	
	<i>M. pneumoniae</i>	L	A2062G A2062G + L4	M16, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> M16, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub>	(Pereyre <i>et al.</i> , 2004)
	<i>S. pneumoniae</i>	C	A2062C(4)	M16, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub>	(Depardieu et Courvalin, 2001)
2135 +2157 +2203	<i>H. pylori</i>	C	G2135A + G2157T + T2203C	Clr	(Hao <i>et al.</i> , 2004)
2160-64	<i>H. influenzae</i>	C	A2160U + A2058G A2160U + L4 2160GGA→UAU + L22 C2164G + L4 + L22	Clr, Azi Clr, Azi Clr, Azi Clr, Azi	(Peric <i>et al.</i> , 2003)
2609	<i>E. coli</i>	L	U2609C	Ketolides	(Garza-Ramos <i>et al.</i> , 2001)
2610	<i>S. pneumoniae</i>	L	C2610U	M14 <sup>BN</sup> , Azi <sup>BN</sup> , Cli <sup>BN</sup>	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
2611	<i>C. trachomatis</i>	C	T2611C	Ery, Azi, Jos	(Misyurina <i>et al.</i> , 2004)
	<i>E. coli</i>	L	C2611U	Ery	(Vester et Douthwaite, 2001)
	<i>N. gonorrhoeae</i>	C	C2611U(3)	Ery, Azi	(Ng <i>et al.</i> , 2002)
	<i>M. hominis</i>	C	C2611U + A2059G	ML, Tel	(Pereyre <i>et al.</i> , 2002)
	<i>M. pneumoniae</i>	L	C2611A C2611A + L22 C2611A + L4 + L22	M14, M15, Tel M14, M15, Tel M, Tel	(Pereyre <i>et al.</i> , 2004)
	<i>S. pyogenes</i>	C	C2611U	M15, Cli, S <sub>B</sub>	(Malbrunty <i>et al.</i> , 2002b)
	<i>S. pneumoniae</i>	L	C2611A(3) C2611G(4)	M15, M16, S <sub>B</sub> M14, M15, L, S <sub>B</sub> Azi, Cli	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)
		C	C2611U(2, 4) C2611A(3) + L22	M14, M15, Pri, Tel M14, M15, Q-D	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a ; Canu <i>et al.</i> , 2002) (Canu <i>et al.</i> , 2002)
		C	C2611G(3) C2611G(4) C2611U(4) C2611A	MLS <sub>B</sub> , Tel <sup>BN</sup> M16 <sup>BN</sup> , Cli <sup>BN</sup> NP	(Farrell <i>et al.</i> , 2003) (Pihlajamaki <i>et al.</i> , 2002) (Doktor <i>et al.</i> , 2004) (Farrell <i>et al.</i> , 2004)
2613	<i>S. pneumoniae</i>	L	C2613A(4) C2613U(3)	Azi Azi	(Nagai <i>et al.</i> , 2000)
2617	<i>S. pneumoniae</i>	C	C1617T + L22	Tel <sup>BN</sup>	(Sutcliffe <i>et al.</i> , 2000)
2629	<i>H. pylori</i>	C	U2629C	Clr <sup>BN</sup>	(Fontana <i>et al.</i> , 2002)

<sup>a</sup> Position dans l'ARNr 23S, numérotation *E. coli*.

<sup>b</sup> L, souche isolée au laboratoire ; C, souche clinique.

<sup>c</sup> Le nombre de copies du gène *rrl* muté est signalé entre parenthèses. + L4, + L22, mutation associée dans la protéine ribosomale L4 ou L22.

<sup>d</sup> Phénotype signalé dans la référence correspondante. L'absence de signalement d'une résistance ne correspond pas forcément à la sensibilité mais peut être due à l'absence de signalement dans la référence. M14, M15, M16, macrolides à 14, 15 et 16 atomes ; BN, résistance de bas niveau ; iMLS<sub>B</sub>, phénotype MLS<sub>B</sub> inductible ; cMLS<sub>B</sub>, phénotype MLS<sub>B</sub> constitutif ; NP, non précisé.

Les mutations aux positions 2058 et 2059 confèrent les plus hauts niveaux de résistance. Les mutations A2058G/U ou C confèrent une résistance croisée aux MLS<sub>B</sub>, tandis que l'action synergique des streptogramines n'est pas affectée et que la fixation des kétolides reste efficace (Ackermann et Rodloff, 2003) (**Tableau 1**). Les mutations A2059G/C confèrent plutôt une résistance de type ML et semblent plus coûteuses en terme de vitalité (coût biologique ou *fitness cost*) pour la bactérie (Sander *et al.*, 2002).

En général, les mutations aux autres positions de la boucle centrale du domaine V confèrent une résistance de plus bas niveau aux MLS. Certaines (2609, 2610, 2613) n'ont pour l'instant été observées que chez des mutants *in vitro* et jamais chez des souches cliniques, sans doute parce que leur niveau de résistance ne suffit pas à leur survie en présence d'un traitement antibiotique. D'autres positions, notamment 2451, 2503, 2505, 2506, 2585 et 2586 ont été identifiées comme participant à la fixation des MLS au ribosome par des expériences d'empreinte chimique ou par cristallographie mais aucune mutation de ces positions n'a été associée à une résistance aux macrolides *in vitro* ou *in vivo* (**Figure 19**, **Tableau 1**).

#### ◆ **Domaine II**

Quelques positions dont la mutation confère la résistance à un ou plusieurs MLS ont été identifiées. En particulier, une mutation U754A confère une résistance de bas niveau à l'érythromycine et à la télithromycine chez *E. coli* (Ackermann et Rodloff, 2003). D'autre part, la délétion A752 associée à une mutation en position 2058 provoque une résistance croisée aux macrolides à 14 et 15 atomes et à la télithromycine (Canu *et al.*, 2004). Ces observations confirment l'importance du domaine II de l'ARNr 23S dans le mécanisme d'action des kétolides, mais elles sont infirmées par une étude récente qui montre que les mutations associées du domaine II et du domaine V de l'ARNr 23S ne sont pas suffisantes pour conférer une résistance significative aux kétolides (Novotny *et al.*, 2004).

#### ◆ **Importance du nombre de copies du gène *rml***

On voit dans le **tableau 1** que la grande majorité des mutations de l'ARNr 23S concerne des mycobactéries ou *H. pylori*. Cela peut s'expliquer par le fait que ces espèces ne possèdent qu'un petit nombre de copies du gène *rml* (1 ou 2). Dans ce cas, la mutation d'un seul gène suffit à conférer la résistance, du fait du caractère dominant de la mutation (Sander *et al.*, 1997). Depuis peu, on observe cependant des souches cliniques de *S. pneumoniae*, possédant 4 copies de *rml*, qui présentent des phénotypes de résistance par mutation.

Lorsqu'une seule copie est mutée, on observe déjà une augmentation de la CMI, mais la résistance franche ne peut s'exprimer que lorsqu'au moins 2 copies (la moitié) sont mutées (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a ; Farrell *et al.*, 2003). Cependant, ce mécanisme reste minoritaire par rapport aux phénomènes de méthylation de la cible (Farrell *et al.*, 2004).

On peut donc penser que le risque de développer une résistance aux macrolides par mutation de l'ARNr est plus important chez les espèces possédant un petit nombre de copies du gène *rpl*.

### **b) Mutations dans les protéines ribosomales**

Des mutations des protéines ribosomales L4 et L22 ont également été identifiées comme responsables de la résistance à l'érythromycine (**tableaux 2 et 3**). Ces protéines sont codées respectivement par les gènes *rplD* et *rplV* de l'opéron S10 (Zurawski et Zurawski, 1985) et se situent à proximité immédiate du centre peptidyl transférase, cible des MLS (chapitre C.1.c, page 57). Chez *E. coli*, par exemple, qui possède 7 copies du gène *rpl*, la majorité des mutants résistants à l'érythromycine générés en laboratoire présentent des altérations dans l'une ou l'autre de ces protéines (Wittmann *et al.*, 1973).



**Tableau 2.** Mutations de la protéine ribosomale L4 (gène *rplD*) responsables de résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes. D'après Pereyre (2003)

Bactérie	Isolement <sup>a</sup>	Mutation <sup>b</sup>	Phénotype <sup>c</sup>	Références
<i>E. coli</i>	L	ND	Ery	(Wittmann <i>et al.</i> , 1973)
		K63E	Ery	(Chittum et Champney, 1994)
<i>H. influenzae</i>	L	G65D	M14, Cli	(Clark <i>et al.</i> , 2002)
		Del <sub>65</sub> GR	Ery, Azi, Q-D	
		G53A, Del <sub>66</sub> RA	M14	
	C	Ins <sub>63</sub> GT	Clr, Azi	(Peric <i>et al.</i> , 2003)
		K61Q	Clr, Azi	
		T64K	Clr, Azi	
		T64K + L22	Clr, Azi	
		T64K + L4 + L22	Clr, Azi	
		G65D	Clr, Azi	
		A69S	Clr, Azi	
		T82I	Clr, Azi	
		D94E + L22	Clr, Azi	
		D139G + 23S	Clr, Azi	
<i>M. pneumoniae</i>	L	Ins <sub>60</sub> G	ML, Tel	(Pereyre <i>et al.</i> , 2004)
		Ins <sub>60</sub> GG ou <sub>60</sub> GGG	ML, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	
		H70R	M16, Cli	
		H70L + 23S + L22	M, Tel	
<i>S. pneumoniae</i>	L	G69C	M15, M16, S <sub>B</sub>	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)
		Ins <sub>68</sub> SQ	M15, S <sub>B</sub>	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000a)
		G71R + L22	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
	C	<sub>69</sub> GTG <sub>71</sub> →TPS	MS <sub>B</sub>	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000b ; Nagai <i>et al.</i> , 2002 ; Pihlajamaki <i>et al.</i> , 2002)
		Ins <sub>69</sub> GTGREK	MS <sub>B</sub> , Tel	(Tait-Kamradt <i>et al.</i> , 2000b)
		Ins <sub>68</sub> RRQ	M14, M14	(Nagai <i>et al.</i> , 2002)
		S20N + 23S	iMLS <sub>B</sub>	(Reinert <i>et al.</i> , 2003)
		S20N, A197V + 23S	cMLS <sub>B</sub>	
		R95H	cMLS <sub>B</sub>	
		I78V + 23S	ML	(Farrell <i>et al.</i> , 2004)
		G71R + 23S	ML	
		Del <sub>69</sub> GTGR + K68S	ML, Q-D	
		Ins <sub>69</sub> E	ML	
		Del <sub>65</sub> WR	ML	
		<sub>69</sub> GT <sub>70</sub> →VP	ML	
K68Q	ML			
E30K + <sub>69</sub> GTG <sub>71</sub> →TPS + V88I	ML			
<i>S. pyogenes</i>	C	Ins <sub>70</sub> KG	M15, M16	(Malbruny <i>et al.</i> , 2002b)
		Del <sub>64</sub> WR	Ery <sup>BN</sup> , Azi	(Bingen <i>et al.</i> , 2002)
		Del <sub>69</sub> TG	Ery <sup>BN</sup> , Azi	
		Ins <sub>73</sub> RA	Ery <sup>BN</sup> , Azi, Jos	
<i>Streptococcus oralis</i>	C	Ins <sub>71</sub> RREKGTG	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	(Canu <i>et al.</i> , 2001)
Streptocoque G	C	Ins <sub>72</sub> EGTGR	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	(Canu <i>et al.</i> , 2001)

<sup>a</sup> L, souche isolée au laboratoire ; C, souche clinique.

<sup>b</sup> Les positions correspondent à celles des protéines de l'espèce. ND, non déterminé ; Del, délétion ; Ins, Insertion ; + L22, mutation associée dans le gène *rplV* ; + 23S, mutation associée dans le gène *rpl*.

<sup>c</sup> Phénotype signalé dans la référence correspondante. L'absence de signallement d'une résistance ne correspond pas forcément à la sensibilité mais peut être due à l'absence de signallement dans la référence. M14, M1, M16, macrolides à 14, 15 et 16 atomes ; BN, résistance de bas niveau ; iMLS<sub>B</sub>, phénotype MLS<sub>B</sub> inductible ; cMLS<sub>B</sub>, phénotype MLS<sub>B</sub> constitutif ; NP, non précisé.

**Tableau 3.** Mutations de la protéine ribosomale L22 (gène *rplV*) responsables de résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes. D'après Pereyre (2003)

Bactérie	Isolement <sup>a</sup>	Mutation <sup>b</sup>	Phénotype <sup>c</sup>	Références
<i>E. coli</i>	L	ND	Ery	(Wittmann <i>et al.</i> , 1973)
		Del <sub>82</sub> MKR	Ery	(Chittum et Champney, 1994)
<i>H. influenzae</i>	L	R88P	M14, M15, Q-D	(Clark <i>et al.</i> , 2002)
		A94E	M14, M15, Q-D	
		Del <sub>82</sub> M	M14, M15, Cli	
		Del <sub>82</sub> MKR	M14, M15	
		Ins <sub>72</sub> KIFVEVA	M14, M15	
	C	G91D	Clr, Azi	(Peric <i>et al.</i> , 2003)
		Del <sub>81</sub> S	Clr, Azi	
		Del <sub>82</sub> M	Clr, Azi	
		Del <sub>95</sub> RI	Clr, Azi	
		Del <sub>96</sub> ILK	Clr, Azi	
		Del <sub>96</sub> ILKR + L4	Clr, Azi	
		Dup <sub>77</sub> DEGPSM	Clr, Azi	
		Dup <sub>88</sub> RAKG	Clr, Azi	
		Ins <sub>91</sub> KG	Clr, Azi	
		Ins <sub>91</sub> RAG	Clr, Azi	
		Ins <sub>91</sub> RADR	Clr, Azi	
		G91D + L4	Clr, Az	
G91D + L4 + 23S	Clr, Az			
Del <sub>95</sub> RI + 23S	Clr, Az			
<i>Streptococcus mitis</i>	C	A105G, T108A	ML, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub>	(Achour <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. pneumoniae</i>	C	A114T + 23S	M14, M15, Tel	(Pereyre <i>et al.</i> , 2004)
		A114T + P112R + 23S + L4	M, Tel	
		A114T + 23S + L4	M, Tel	
		Del <sub>111</sub> IPRA	M, Tel	
<i>S. aureus</i>	L	Del <sub>79</sub> GP	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	(Malbruny <i>et al.</i> , 2002a)
		Dup <sub>84</sub> GPTLK	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	
		Del <sub>98</sub> KR, Dup <sub>101</sub> SAINKTR	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	
		Del <sub>99</sub> R, Ins <sub>101</sub> IHITI	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	
		Dup <sub>101</sub> SAINKTR	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	
	Dup <sub>101</sub> SAINKTR	Ery, S <sub>A</sub> -S <sub>B</sub> , Tel	(Malbruny <i>et al.</i> , 2002a)	
	C	A97D	NP	(Sutcliffe <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. pneumoniae</i>	L	G83E, P91S, A93E	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	(Canu <i>et al.</i> , 2002)
		A93E + 23S	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	
		G95D	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	
		G95D + L4	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	
		P99Q	M14, M15, Pri, Tel <sup>BN</sup>	
	C	K94Q + <i>erm</i> (B) <sup>d</sup>	Tel	(Walsh <i>et al.</i> , 2003)
		Dup <sub>103</sub> RTAHIT	Ery, Azi, Q-D	(Musher <i>et al.</i> , 2002)
		Dup <sub>103</sub> RTAHI	M, Q-D	(Jones <i>et al.</i> , 2003)
		G95D + 23S	M, Q-D	(Farrell <i>et al.</i> , 2003)
		C117T + L4	M14, M15, M16	(Reinert <i>et al.</i> , 2003)

<sup>a</sup> L, souche isolée au laboratoire ; C, souche clinique.

<sup>b</sup> Les positions correspondent à celles des protéines de l'espèce. ND, non déterminé ; Del, délétion ; Ins, Insertion ; Dup, duplication ; + L4, mutation associée dans le gène *rplD* ; + 23S, mutation associée dans le gène *rrl*.

<sup>c</sup> Phénotype signalé dans la référence correspondante. L'absence de signalement d'une résistance ne correspond pas forcément à la sensibilité mais peut être due à l'absence de signalement dans la référence. M14, M15, M16, macrolides à 14, 15 et 16 atomes ; BN, résistance de bas niveau ; NP, non précisé.

<sup>d</sup> Gène *erm*(B) muté et altération de sa séquence régulatrice.

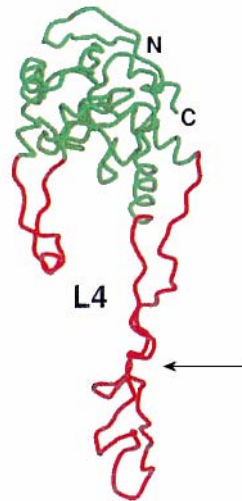
#### ◆ Protéine ribosomale L4

Cette protéine a été modélisée par cristallographie aux rayons X chez la bactérie *Thermotoga maritima* (Worbs *et al.*, 2000). Elle présente, en plus de l'alternance feuillet  $\beta$ /hélices  $\alpha$ , une grande boucle désordonnée de 55 acides aminés, qui correspond à la structure la plus conservée chez les bactéries et pourrait prendre une forme structurée dans le ribosome (**Figure 21**). Elle interagit avec l'ARNr principalement au niveau des domaines I et II mais également au niveau du domaine V de l'ARNr 23S (Worbs *et al.*, 2000 ; Ban *et al.*, 2000). Elle joue également un rôle dans la régulation de sa propre expression en agissant sur l'opéron S10 qui code pour 11 protéines ribosomales, dont elle fait partie (Worbs *et al.*, 2000).

Les mutations de cette structure conférant une résistance aux MLS sont situées dans la région conservée (**Figure 21**). Elles ont été décrites aussi bien chez des souches de laboratoire que chez des souches cliniques (**Tableau 2**). Elles sont particulièrement présentes chez certaines souches cliniques de *S. pneumoniae* isolées en Europe de l'est, où 15,6% des souches sont touchées par ce phénomène, les mutations retrouvées leur conférant une résistance de type MS<sub>B</sub> (Nagai *et al.*, 2002). Ces mutations provoqueraient en fait un effet indirect en modifiant la structure tridimensionnelle du ribosome, modifiant ainsi le site de fixation des antibiotiques (Gregory et Dahlberg, 1999a). Ces ribosomes présentent d'ailleurs un rétrécissement de l'entrée du tunnel de sortie des polypeptides (Gabashvili *et al.*, 2001).

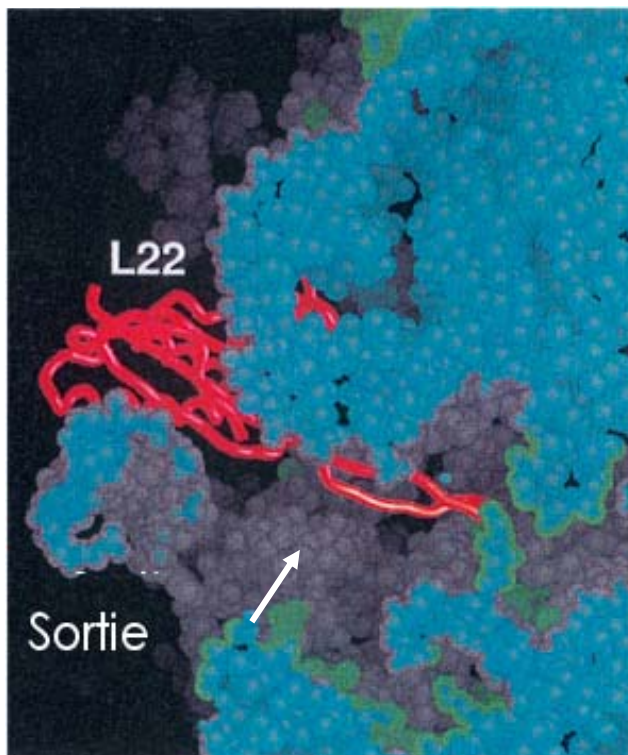
#### ◆ Protéine ribosomale L22

La structure de cette protéine a été modélisée par cristallographie aux rayons X chez la bactérie *T. thermophilus* (Unge *et al.*, 1998). Il s'agit d'une petite protéine formée de 3 hélices  $\alpha$  et 3 feuillets  $\beta$ . Elle présente la particularité d'être constituée d'un cœur hydrophobe compact d'où émane une épingle  $\beta$  formée par deux de ses feuillets  $\beta$ , dont la longueur est constante chez toutes les espèces (**Figure 22**). Cette boucle constitue en partie la paroi interne du tunnel peptidique au sein du ribosome bactérien et elle jouerait un rôle dans les premières étapes de l'assemblage du ribosome en maintenant à proximité les domaines V et II de l'ARNr 23S (Nissen *et al.*, 2000 ; Ban *et al.*, 2000).

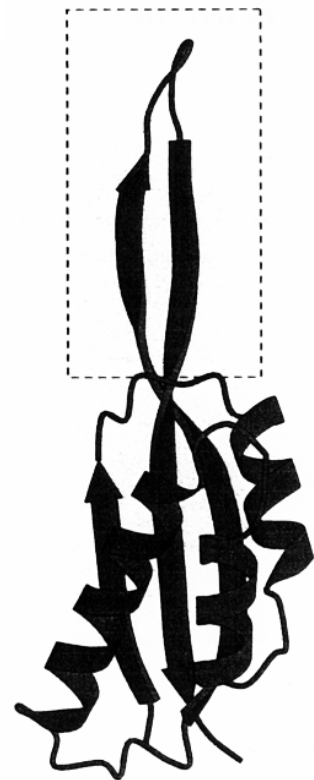


**Figure 21.** Structure de la protéine ribosomale L4 de *H. marismortui*. D'après Ban *et al.* (2000). Les domaines globulaires sont en vert et les extensions non globulaires en rouge. La flèche indique la région où sont situées les mutations associées à des résistances aux MLS. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées par les lettres correspondantes.

**A**



**B**



**Figure 22.** Structure de la protéine ribosomale L22. **A.** Protéine L22 de *H. marismortui*. Grâce à son épingle  $\beta$ , indiquée par une flèche blanche, elle contribue à la formation de la paroi du tunnel de sortie des polypeptides. D'après Ban *et al.* (2000). **B.** Protéine L22 de *T. thermophilus*. La structure conservée correspondant à son épingle  $\beta$ , où se situent les mutations associées à des résistances aux macrolides, est encadrée. D'après Unge *et al.* (1998).

Les mutations de la protéine L22 conférant une résistance aux antibiotiques décrites à ce jour sont situées dans cette épingle  $\beta$ , normalement très conservée. Elles confèrent une résistance aux macrolides et aux streptogramines B mais pas aux lincosamides, et modifient la sensibilité à l'association de streptogramines A et B chez *S. pneumoniae* et *S. aureus*, ce qui pourrait être dû à une perte de la synergie entre les facteurs A et B (Malbruny *et al.*, 2002a) (**Tableau 3**). Elles peuvent aussi être associées à une résistance aux kétolides. Une fois encore, on pense que ces mutations ont un effet indirect sur la conformation du site de fixation des MLS (Gregory et Dahlberg, 1999a). Cette fois cependant, c'est un élargissement de l'entrée du tunnel de sortie des polypeptides au sein du ribosome qui est observé chez les mutants (Gabashvili *et al.*, 2001).

## **RESULTATS**

# **I. CARACTERISATION DES MUTATIONS DE LA CIBLE RIBOSOMALE CHEZ DES SOUCHES CLINIQUES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTANTES AUX MACROLIDES**

## Article 1

**Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Didier Tandé, Bertrand Picard et Roland Leclercq.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**, 3054-3056.

## Article 2

**Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.**

Anne-Laure Prunier, Hiep Trong Nguyen, Didier Tandé, Christine Segond et Roland Leclercq.

*Microbial Drug Resistance*. Sous presse.

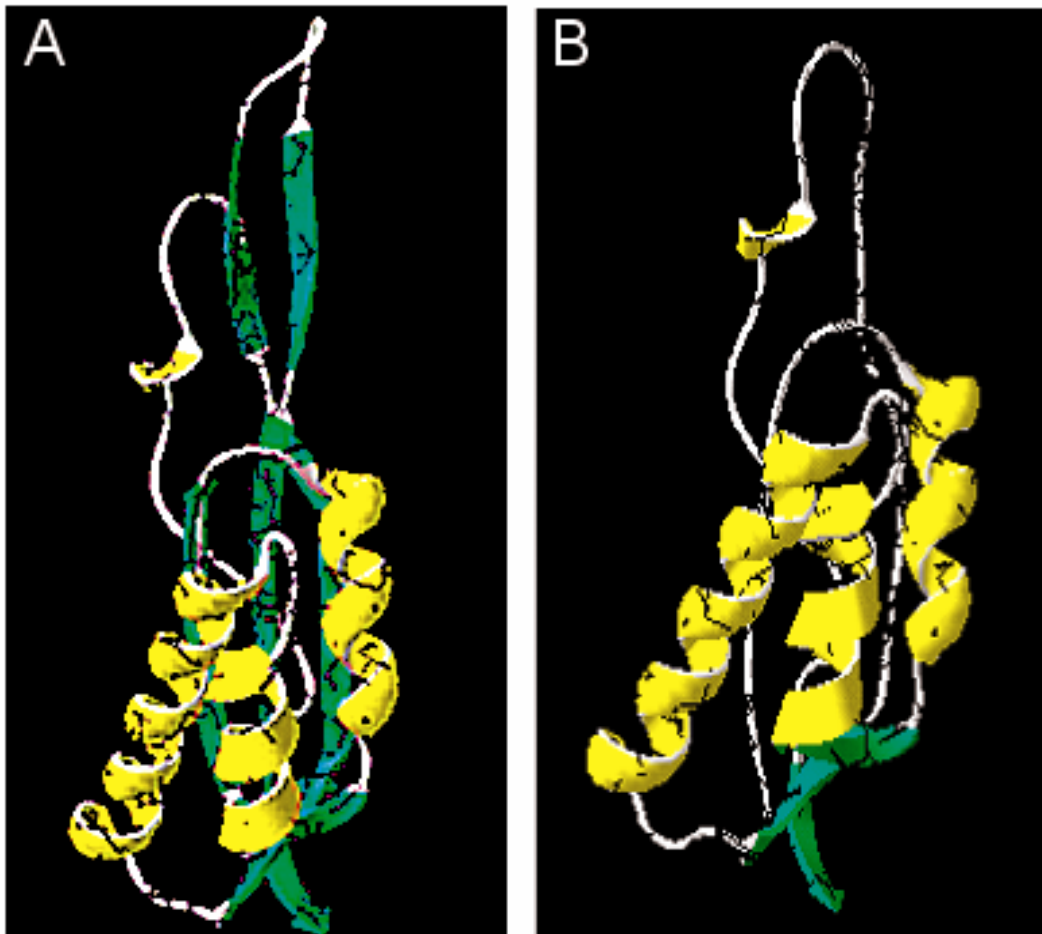
## A. Résumé des résultats présentés dans les articles 1 et 2

Dans le premier article, le support génétique de la résistance aux macrolides (azithromycine et érythromycine) a été étudié chez 12 souches de *S. aureus* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose ayant subi un traitement prolongé à l'azithromycine. Chez 6 de ces souches, les gènes de résistance acquis classiques, codant pour une modification du ribosome (gènes *erm*) ou un efflux des macrolides (gène *msr(A)*), n'ont pu être détectés par PCR. Nous avons donc recherché des mutations dans les structures connues pour conférer la résistance aux macrolides chez d'autres espèces. Les gènes codant pour les protéines ribosomales L4 et L22, ainsi que des portions des domaines V et II de l'ARN ribosomal 23S ont été amplifiés par PCR puis analysés par SSCP et séquencés s'ils présentaient un profil de migration différent d'un témoin non muté. Nous avons pu mettre en évidence des mutations dans ces structures chez les 6 souches : toutes contenaient une mutation à la position 2058 ou 2059 du domaine V de l'ARNr 23S (4 contenaient la mutation A2058G, 1 la mutation A2058T et 1 la mutation A2059G). Chez l'une de ces souches, cette mutation était associée à une délétion de 3 acides aminés dans une portion conservée de la protéine L22.

L'étude de l'effet de cette délétion sur la structure de la protéine a par la suite été réalisée à l'aide du logiciel de modélisation SWISS-MODEL (Guex et Peitsch, 1997) et le résultat est présenté **figure 23**. Cette délétion se traduit par une modification des feuilletts  $\beta$  de la protéine, provoquant un réarrangement important de celle-ci. La zone touchée correspond à l'épingle  $\beta$ , normalement très conservée, et que l'on suppose être impliquée dans l'assemblage des ribosomes et la formation du tunnel de sortie des polypeptides (Etude bibliographique, chapitre D.2.b., page 74) .

Dans cet article, nous avons également mis au point une stratégie pour déterminer le nombre de copies des gènes codant pour l'ARNr 23S touchées par ces mutations (gènes *rrl* présents en 5 ou 6 copies selon les souches chez *S. aureus*). Nous avons utilisé des amorces spécifiques de chaque région se trouvant en 3' de chaque copie, ce qui nous a permis de montrer que chez toutes nos souches résistantes aux macrolides par mutation de l'ARNr 23S, au moins la moitié des copies des gènes *rrl* présentaient une mutation (3 ou 4 copies mutées sur 5 ou 6 copies présentes dans le chromosome). Ces résultats confirment ceux qui avaient été obtenus pour *Streptococcus pneumoniae* résistants aux macrolides par mutation ribosomale, qui présentaient au moins 2 copies mutées sur les 4 que compte l'espèce (Tait-Kamradt *et al.*, 2000a).





**Figure 23.** Modélisation de la structure tertiaire de la protéine L22 par le logiciel SWISS-MODEL (Guex et Peitsch, 1997). A. Structure de la protéine sauvage. B. Structure de la protéine mutée de la souche UCN 15.

Dans le second article, nous avons étudié le support génétique de la résistance aux macrolides chez 2 souches de *Staphylococcus aureus* présentant un phénotype inhabituel, avec une résistance croisée à l'érythromycine et à la spiramycine, mais une sensibilité à la clindamycine. Ces 2 souches ne possédaient pas de gènes de résistance acquis (*erm* ou *msr(A)*). Le séquençage des gènes connus pour conférer la résistance aux macrolides chez d'autres espèces a mis en évidence des mutations dans des régions conservées de la protéine ribosomale L4. Une des deux souches contenait une substitution R168S et les deux souches présentaient les substitutions G69A et T70P. Ces dernières positions sont situées dans une région très conservée de la protéine L4 et sont connues pour conférer la résistance aux macrolides chez d'autres espèces (Etude bibliographique, **Tableau 2**, page 72). La substitution R168S est également située dans une région conservée de la protéine mais n'a jamais été décrite auparavant. Elle pourrait être liée à une augmentation de la CMI des streptogramines observée chez cette souche. Ces résultats étendent les observations déjà faites de mutations similaires chez les streptocoques et les mycoplasmes résistants aux macrolides à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Nous pensons que les mécanismes inhabituels de résistance aux macrolides chez le staphylocoque mis en évidence dans ces deux publications pourraient être mis en relation avec le contexte particulier de la mucoviscidose. Ces patients sont en effet soumis à de multiples traitements antibiotiques, et le traitement par l'azithromycine de longue durée pourrait favoriser l'apparition de mutants résistants.

## ARTICLE 1

**Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Didier Tandé, Bertrand Picard et Roland Leclercq.  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**, 3054-3056.

## ARTICLE 2

**Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of *Staphylococcus aureus*.**

Anne-Laure Prunier, Hiep Trong Nguyen, Didier Tandé, Christine Segond et Roland Leclercq.

*Microbial Drug Resistance*. Sous presse.

## **B. Résultats complémentaires : Analyse des gènes de la protéine A (*spa*) et de la super oxyde dismutase (*sodA*)**

Dans notre approche initiale, l'effet de l'hypermutabilité a été vérifié sur des gènes dont la mutation conférait des résistances aux antibiotiques. La critique peut être faite qu'il est difficile de faire la part entre ce qui revient à l'hypermutabilité et à la pression de sélection par l'antibiotique. Nous avons cherché à obtenir d'autres données susceptibles de prouver que certaines de nos souches présentaient bien un caractère hypermutable. Pour cela, nous avons regardé si d'autres gènes que ceux responsables de la résistance aux macrolides avaient accumulé des mutations. Les gènes *sodA* et *spa* ont été choisis. Ce sont deux gènes domestiques de *S. aureus* impliqués respectivement dans la résistance au stress et la virulence. En effet, la protéine SodA est une super oxyde dismutase permettant à la bactérie de dégrader les anions super oxydes ( $O_2^-$ ) qui sont de puissants agents mutagènes. Elle est particulièrement exprimée pendant la phase stationnaire de croissance (Clements *et al.*, 1999). La protéine codée par le gène *spa*, dite « protéine A », est un élément important de la virulence puisqu'elle participe à l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte infecté (Jung *et al.*, 2001). Sur la base d'un alignement des séquences de ces gènes chez 4 souches de *S. aureus* entièrement séquencées et disponibles dans les bases de données, nous avons défini des amorces dans des zones particulièrement bien conservées permettant d'amplifier des fragments d'environ 500 pb chez 4 souches de *S. aureus* résistants aux macrolides présentant une accumulation particulièrement importante de mutations ribosomales, parfois associées à la présence d'un gène de résistance (souches 3A, 3C, 5B et 6C ; voir article 3). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 4**. Les souches 3A et 5B présentent des altérations particulièrement importantes des deux structures étudiées se traduisant par de nombreuses altérations dans les deux protéines. La souche 3C présente de nombreuses altérations dans la portion du gène *spa* séquencée, mais pas dans la portion du gène *sodA*. Enfin, la souche 6C ne présente pas d'altérations notables de SodA et de la protéine A.

Ces résultats nous ont confortés dans l'idée que certaines de nos souches devaient présenter un caractère hypermutable, puisque même des structures correspondant à des gènes domestiques semblaient touchées par une accumulation de mutations, dont beaucoup étaient silencieuses.

**Tableau 4.** Résultats du séquençage des gènes *sodA* et *spa* chez 4 souches de *S. aureus* présentant de nombreuses mutations ribosomales.

Souche	Altérations dans les protéines	
	SodA	Protéine A
3A	10 substitutions + nombreuses mutations silencieuses dans <i>sodA</i>	2 substitutions + 4 mutations silencieuses dans <i>spa</i>
3C	Aucune	11 substitutions + 2 délétions + nombreuses mutations silencieuses dans <i>spa</i>
5B	11 substitutions + nombreuses mutations silencieuses dans <i>sodA</i>	Pas d'amplification possible avec les amorces utilisées
6C	Aucune	1 mutation ponctuelle silencieuse dans <i>spa</i>

## **II. MISE EN EVIDENCE D'UNE FORTE PROPORTION DE SOUCHES HYPERMUTABLES PARMIS LES *S. AUREUS* ISOLEES DE MUCOVISCIDOSE : ROLE DES GENES MUTATEURS**

Article 3

**High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportion of hypermutable strains.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Muriel Laurans, Jacques Brouard, Jean-François Duhamel et Roland Leclercq

*Journal of Infectious Disease*, 2003. **187**, 1709-1716.

Article 4

**Analysis of *mutS* and *mutL* mutator genes in *Staphylococcus aureus*.**

Anne-Laure Prunier et Roland Leclercq.

Soumis pour publication.

## A. Résumé des résultats présentés dans l'article 3

Dans l'article 1, la moitié (6/12) des souches résistantes aux macrolides présentait des mutations de la cible ribosomale des macrolides, au lieu de posséder les gènes de résistance acquis classiques. Dans l'article 3, le champ d'investigation a été élargi à 12 souches supplémentaires pour un total de 24 souches isolées chez 9 patients atteints de mucoviscidose (20 souches résistantes à l'érythromycine et 4 souches sensibles). Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une majorité (13/20) des souches résistantes ne possèdent pas de gènes de résistance mais présentent des mutations de la cible ribosomale des macrolides à des positions connues pour conférer la résistance chez d'autres espèces. Cette étude montre donc que la résistance aux macrolides par mutations de la cible ribosomale de ces antibiotiques semble avoir pris des proportions inquiétantes parmi les souches de *S. aureus* isolées de mucoviscidose.

Or, la majorité des souches résistantes par mutation présentent des altérations au sein de l'ARNr 23S (positions 2058/2059), alors que cette espèce possède plusieurs copies du gène *rrl* codant pour cette structure (5 à 6 copies détectées selon les souches). Les résultats présentés dans l'article 1 avaient montré qu'au moins la moitié de ces copies doivent être mutées pour que la résistance s'exprime. De plus, des études réalisées chez *S. pneumoniae* (Farrell *et al.*, 2003 ; Tait-Kamradt *et al.*, 2000b), *E. faecalis* et *E. faecium* (Marshall *et al.*, 2002) ont montré qu'il existe un phénomène de « *gene dosage* » : on observe une augmentation progressive de la CMI des souches pour les macrolides (chez le pneumocoque) ou le linezolid (chez les entérocoques) en corrélation directe avec le nombre de copies mutées. On peut donc s'étonner de la prévalence de ce mécanisme de résistance chez nos souches, puisqu'il nécessite en fait l'accumulation de plusieurs mutations. De plus, chez certaines souches possédant un gène *erm* ou *msr(A)*, des mutations silencieuses des gènes *rplD* et ou *rplV* ou des mutations du gène *rrl* ne conférant pas *a priori* un avantage pour la résistance ont été détectées. Ces phénomènes pourraient s'expliquer par une proportion plus importante de souches mutatrices retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport aux souches isolées d'autres pathologies, comme cela a déjà été montré chez *P. aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2000).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la fréquence de mutation sur rifampicine d'un panel de souches encore plus important (89 souches isolées chez 25 patients atteints de mucoviscidose), en comparaison avec un panel de souches isolées chez des patients



non atteints de cette maladie (74 souches isolées de sécrétions broncho-pulmonaires ou d'hémocultures). Les fréquences de mutation moyennes des deux groupes présentaient une différence statistiquement significative. Treize souches sur les 89 du groupe mucoviscidose et une seule sur les 74 du groupe témoin présentaient une fréquence de mutation au moins dix fois supérieure à  $10^{-8}$  (fréquence de mutation moyenne normale de *S. aureus* sur rifampicine), ce qui représente également une différence significative entre les deux groupes. Parmi les 89 souches isolées de mucoviscidose, 7 correspondaient à des souches étudiées dans l'article 1. Trois de ces souches présentaient un caractère hypermutateur tandis que les quatre autres étaient non mutatrices alors qu'elles présentaient plusieurs mutations ribosomales. Nous avons testé la fréquence de mutation de 3 souches hypermutables et de deux souches contrôles sensibles aux macrolides sur érythromycine et azithromycine. Les fréquences de mutation des souches hypermutables étaient situées entre  $10^{-8}$  et  $10^{-6}$  pour l'érythromycine et entre  $2 \cdot 10^{-5}$  et  $3 \cdot 10^{-7}$  pour l'azithromycine, alors que pour les témoins, les valeurs étaient comprises entre  $2 \cdot 10^{-9}$  et  $2,6 \cdot 10^{-9}$  pour l'érythromycine et entre  $5,2 \cdot 10^{-9}$  et  $7,6 \cdot 10^{-9}$  pour l'azithromycine (résultats détaillés chapitre D.2, page 96). D'une manière générale, c'est la première fois qu'un lien direct entre l'hypermutabilité et la résistance aux antibiotiques par mutation est mis en évidence.

Les infections associées à la mucoviscidose nécessitent l'administration prolongée d'antibiotiques, ce qui correspond en fait aux meilleures conditions pour l'apparition de mutations conférant la résistance. Cette étude confirme ce risque et suggère que des stratégies thérapeutiques combinant plusieurs antibiotiques pour prévenir l'apparition de mutants résistants devraient être étudiées.

Le gène *mutS*, très conservé au sein de l'espèce *S. aureus* (**Figure 24A**), a été entièrement séquencé chez toutes nos souches hypermutables et également chez les 4 souches non mutatrices présentant de nombreuses mutations ribosomales. Parmi ces 4 souches, 2 semblent présenter une large délétion ou une altération substantielle du gène puisqu'il n'a pu être détecté ni par PCR ni par hybridation en Southern blot. Une troisième souche présente plusieurs substitutions réparties tout au long de la protéine, et la dernière ne présente aucune altération du gène *mutS*. Sur les 13 souches mutatrices, 5 présentent des mutations : une présente une large délétion de 41 acides aminés dans la partie centrale de la protéine, trois autres présentent plusieurs substitutions réparties sur toute la séquence protéique, et la dernière, correspondant à l'unique souche hypermutatrice non isolée de mucoviscidose, n'a pu

## A

```
mu50      661 TTLDQALPSLKNVHVAANEYKGEIIFLHKVKDGAVDSDSYGIQVAKLADLPEKVISRAQVI
MW2       661 TTLDQALPSLKNVHVAANEYKGEIIFLHKVKDGAVDSDSYGIQVAKLADLPEKVISRAQVI
N315     661 TTLDQALPSLKNVHVAANEYKGEIIFLHKVKDGAVDSDSYGIQVAKLADLPEKVISRAQVI
8325-4   661 TTLDQALPSLKNVHVAANEYKGEIIFLHKVKDGAVDSDSYGIQVAKLADLPEKVISRAQVI
          *****

mu50      721 LSEFEASAGKKSSISNLKMVENEPEINQENLNLSVEETTDTLTSQKDFEQASFDLFENDQE
MW2       721 LSEFEASAGKKSSISNLKMVENEPEINQENLNLSVEETTDTLTSQKDFEQASFDLFENDQE
N315     721 LSEFEASAGKKSSISNLKMVENEPEINQENLNLSVEETTDTLTSQKDFEQASFDLFENDQE
8325-4   721 LSEFEASAGKKSSISNLKMVENEPEINQENLNLSVEETTDTLTSQKDFEQASFDLFENDQE
          *****

mu50      781 SEIELQIKNLNLSNMTPIEALVKLSELQNQLK
MW2       781 SEIELQIKNLNLSNMTPIEALVKLSELQNQLK
N315     781 SEIELQIKNLNLSNMTPIEALVKLSELQNQLK
8325-4   781 SEIELQIKNLNLSNMTPIEALVKLSELQNQLK
          *****
```

## B

```
MW2       241 TKLEVRLSKEEQLYQLIVSKIQEAFKDRILIPKNNLDYVPKKNKVLHSFEQQKIEFEQRQ
8325-4   241 TKLEVRLSKEEQLYQLIVSKIQEAFKDRILIPKNNLDYVPKKNKVLHSFEQQKIEFEQRQ
N315     241 TKLEVRLSKEEQLYQLIVSKIQEAFKDRILIPKNNLDYVPKKNKVLHSFEQQKIEFEQRQ
mu50     241 TKLEVRLSKEEQLYQLIVSKIQEAFKDRILIPKNNLDYVPKKNKVLHSFEQQKIEFEQRQ
          *****

MW2       301 NTENNQEKTFSSSEESNSKPFMVENONDEIVIREDSYNPFVTKTSESLIADDESSGYNTR
8325-4   301 NTENNQEKTFSSSEESNSKPFMEENRNDEIVIKEDSYNPFVTKTSESLIADDESSGYNTR
N315     301 NTENNQEKTFSSSEESNSKSFMAENONDEIVIKEDSYNPFVTKTSESLIADDESSGYNTR
mu50     301 NTENNQEKTFSSSEESNSKSFMAENONDEIVIKEDSYNPFVTKTSESLIADDESSGYNTR
          *****

MW2       361 EKDEDYFKKQQEILQEMDQTFDSNDDTSVQNYENKASDDYDVNDIKGTKSKDPKRRIPY
8325-4   361 EKDEDYFKKQQEILQEMDQTFDSNDGTTVQNYENKASDDYDVNDIKGTKSKDPKRRIPY
N315     361 EKDEDYFKKQQEILQEMDQTFDSNEDASVQNYENKASDDYDVNDIKGTKSKDPKRRIPY
mu50     361 EKDEDYFKKQQEILQEMDQTFDSNEDASVQNYENKASDDYDVNDIKGTKSKDPKRRIPY
          *****
```

**Figure 24.** Alignements multiples de portions des protéines MutS et MutL de *S. aureus*. **A.** Alignement multiple de la partie C terminale de MutS chez quatre souches de *S. aureus* : 8325-4, mu50, MW2 et N315. Une seule substitution d'acide aminé a pu être détectée sur l'ensemble de la protéine (surlignée). **B.** Alignement multiple de la partie centrale de MutL chez quatre souches de *S. aureus* : 8325-4, mu50, MW2 et N315. Quelques substitutions d'acides aminés ont pu être détectées sur l'ensemble de la protéine (surlignées).

être que partiellement amplifiée pour le gène *mutS* qui semble en partie délété. Au total, des altérations de ce gène ont été détectées chez 8/15 souches mutatrices ou présentant de nombreuses mutations dans des gènes normalement très conservés. Les conséquences de ces altérations n'ont pas été étudiées dans le cadre de cet article mais les plus étendues devraient conduire à un défaut de réparation de l'ADN chez ces souches. Chez les souches mutatrices ne présentant pas d'altérations de *mutS*, d'autres gènes mutateurs sont sans doute impliqués. Deux souches semblent dépourvues du gène mais ne présentent pas un caractère mutateur, ce qui irait à l'encontre de la supposition que *mutS* soit impliqué dans l'hypermutableté chez *S. aureus*. Cependant, nous pensons que ces deux souches, qui cumulent le plus grand nombre de mutations ribosomales, pourraient représenter l'étape ultime de l'évolution des staphylocoques dans l'histoire naturelle de la colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose. En effet, plusieurs études montrent que l'avantage initial conféré par l'hypermutableté pourrait être remis en cause par de multiples pertes de fonction coûteuses pour la bactérie. Les mutations favorables seraient donc stabilisées par la récupération des fonctions réparatrices de l'ADN, soit en récupérant le gène fonctionnel (ce qui n'est pas le cas ici), soit en compensant cette perte par un autre mécanisme inconnu.

## ARTICLE 3

**High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportion of hypermutable strains.**

Anne-Laure Prunier, Brigitte Malbruny, Muriel Laurans, Jacques Brouard, Jean-François Duhamel et Roland Leclercq

*Journal of Infectious Disease*, 2003. **187**, 1709-1716.

## B. Résultats complémentaires : Analyse des différentes copies du gène *rrl* portant plusieurs mutations adjacentes

Chez de nombreuses souches résistantes aux macrolides, nous avons mis en évidence l'existence de mutations dans les structures ribosomales cibles de ces antibiotiques. Chez certaines souches, l'association de plusieurs mutations a été détectée au sein du gène codant l'ARNr 23S (gène *rrl*). Ainsi, la souche 4A présente les mutations T2089C et C2207T, tandis que les souches 5C, 5D et 5E présentent les mutations A2058G et C2207T associées. Seule la position 2058 est connue pour conférer la résistance aux macrolides lorsqu'elle est modifiée, tandis que la position 2207 n'entre pas dans la composition du site de fixation des macrolides sur le ribosome (**Figure 19**, page 60). De plus, pour la souche 4A, les mutations sont détectées alors que la souche possède déjà un gène de résistance aux macrolides (gène *msr(A)*). Nous avons montré dans l'article 1 que chez 6 souches résistantes aux macrolides par mutation de l'ARNr, au moins la moitié des copies du gène *rrl* était mutée. Or, il y a en fait deux manières pour la souche d'acquérir ces mutations : muter successivement chaque copie ou réaliser la dissémination d'une première mutation par conversion génique (recombinaison intra-chromosomique) successivement entre chaque copie. L'espèce *S. aureus* comportant 5 ou 6 copies du gène *rrl* codant les ARNr selon les souches, nous avons vérifié par séquençage de chaque copie individuellement, en utilisant les amorces présentées dans l'article 1, que les mutations multiples étaient constamment associées sur une même copie chez les quelques isolats présentant des mutations adjacentes sur le gène *rrl*. Les résultats obtenus après séquençage de chaque copie du gène sont présentés dans le **tableau 5**. Chez toutes les souches présentant deux mutations adjacentes, celles-ci sont constamment associées sur chaque copie mutée.

**Tableau 5.** Résultats du séquençage de chaque copie du gène *rrl* chez les souches présentant deux mutations ribosomales proches.

Souche Mutations	Copie A	Copie B	Copie C	Copie D	Copie E	Copie F
<b>4A</b> 2089C, 2207T	2089C, 2207T	-	2089C, 2207T	-	2089C, 2207T	-
<b>5C</b> 2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T
<b>5D</b> 2058G, 2207T	2058G, 2207T	-	2058G, 2207T	-	2058G, 2207T	2058G, 2207T
<b>5E</b> 2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	2058G, 2207T	-	2058G, 2207T	2058G, 2207T

Ces résultats vont dans le sens d'un mécanisme d'acquisition des mutations sur une seule copie suivi d'une dissémination des mutations par recombinaison. Ce phénomène d'homogénéisation des copies des gènes codant les ARNr a en effet déjà été observé chez *E. coli* (Hashimoto *et al.*, 2003).

### C. Résumé des résultats présentés dans l'article 4

Dans l'article 4, une étude plus complète des gènes *mutS* et *mutL* de *S. aureus* a été réalisée. Le gène *mutL* est également bien conservé chez *S. aureus*, malgré la présence de quelques acides aminés variables dans la partie centrale de la protéine (**Figure 24B**). Une analyse *in silico* a montré que les deux gènes *mutS* et *mutL* sont adjacents et dans la même orientation sur le chromosome de *S. aureus*, suggérant une organisation en opéron. Une analyse par RT-PCR a confirmé cette hypothèse, tout en nous permettant de constater que l'inactivation de *mutS* par insertion d'un plasmide thermosensible n'avait pas d'effet sur l'expression des autres gènes de l'opéron (*mutL* et *glpP*).

L'étude par PCR inverse de l'unique souche hypermutable non isolée de mucoviscidose a montré que celle-ci présentait une large délétion de 5060 pb couvrant les deux gènes *mutS* et *mutL*. Le séquençage de *mutS* et *mutL* chez 11 souches hypermutables a montré que 5 d'entre elles présentaient des altérations soit dans l'un des gènes, soit dans les deux. Les mutations de *mutS* rapportées dans l'article 3 sur les souches UCN28 et UCN31 n'ont pas été confirmées. Deux souches présentaient des mutations dans *mutS* : les souches 1A et UCN29. Pour toutes les deux, les positions mutées correspondent à des parties connues pour être impliquées dans diverses fonctions de la protéine. Pour ce qui est de *mutL*, 3 souches présentaient des mutations : UCN27 présentait une délétion de 5 acides aminés dans la partie N-terminale de la protéine, dans une zone connue pour participer à l'activité ATPase de MutL, et UCN28 et UCN29 présentaient respectivement 1 et 3 substitutions d'acides aminés dans la partie centrale de la protéine, sans que les positions mutées ne correspondent à des positions particulièrement connues comme étant importantes pour le fonctionnement de la protéine.

Les souches *S. aureus mutS2* (inactivée dans *mutS*) et *mutL* (inactivée dans *mutL*) ont été construites par insertion d'une cassette conférant la résistance à la kanamycine au milieu du gène ciblé. Les gènes *mutS* et *mutL* de *S. aureus* RN4220 et des souches hypermutables présentant des altérations importantes de ces structures ont été clonés et introduits chez la souche de référence *S. aureus* RN4220 et dans les souches *S. aureus mutS2* et *mutL* afin

d'étudier l'effet des mutations détectées chez les souches cliniques sur l'hypermutabilité chez cette espèce. Une analyse des fréquences de mutation sur rifampicine a montré que les deux souches *S. aureus mutS2* et *mutL* présentent bien une fréquence de mutation augmentée, qui peut être ramenée à une valeur proche de la normale par complémentation avec un plasmide portant le gène sauvage. Les mutations de *mutS* détectées chez 1A et UCN29 semblent être responsables de l'hypermutabilité des souches dans la mesure où elles ne complètent pas l'inactivation de *mutS2*. Pour le gène *mutL*, il ne semble pas que les substitutions détectées chez UCN29 soient responsables de l'hypermutabilité, mais la délétion de 5 acides aminés détectée chez UCN27 pourrait par contre expliquer le phénotype hypermutable de la souche. Dans la mesure où, chez d'autres espèces, MutS et MutL peuvent être impliqués dans la recombinaison (empêchant la recombinaison entre séquences d'ADN trop divergentes), nous avons fabriqué un modèle d'étude *in vitro* de l'implication de ces protéines dans ce phénomène. Pour cela, nous avons construit une série de six vecteurs thermosensibles portant des fragments d'ADN présentant des pourcentages d'identité variables (de 100% à 74%) avec une portion conservée du gène *sodA* de *S. aureus*. Ces constructions ont ensuite été introduites chez *S. aureus* RN4220, ainsi que dans les deux souches *S. aureus mutS2* et *mutL*. La survie des souches lors de repiquages successifs à 42°C nous a fourni une estimation du taux de recombinaison. Les résultats obtenus semblent montrer que MutS et MutL n'ont qu'un rôle très limité dans la prévention de la recombinaison entre séquences d'ADN divergentes chez *S. aureus*.

Cette étude confirme l'implication de MutS et MutL dans l'hypermutabilité chez *S. aureus*. Elle montre également que, comme cela a déjà été observé chez plusieurs bactéries à Gram positif, les deux gènes sont co-transcrits du fait de leur appartenance à un même opéron.

## ARTICLE 4

**Analysis of *mutS* and *mutL* mutator genes in *Staphylococcus aureus*.**

Anne-Laure Prunier et Roland Leclercq.

Soumis pour publication.



## D. Résultats complémentaires

### 1) Proportion de souches résistantes à l'érythromycine

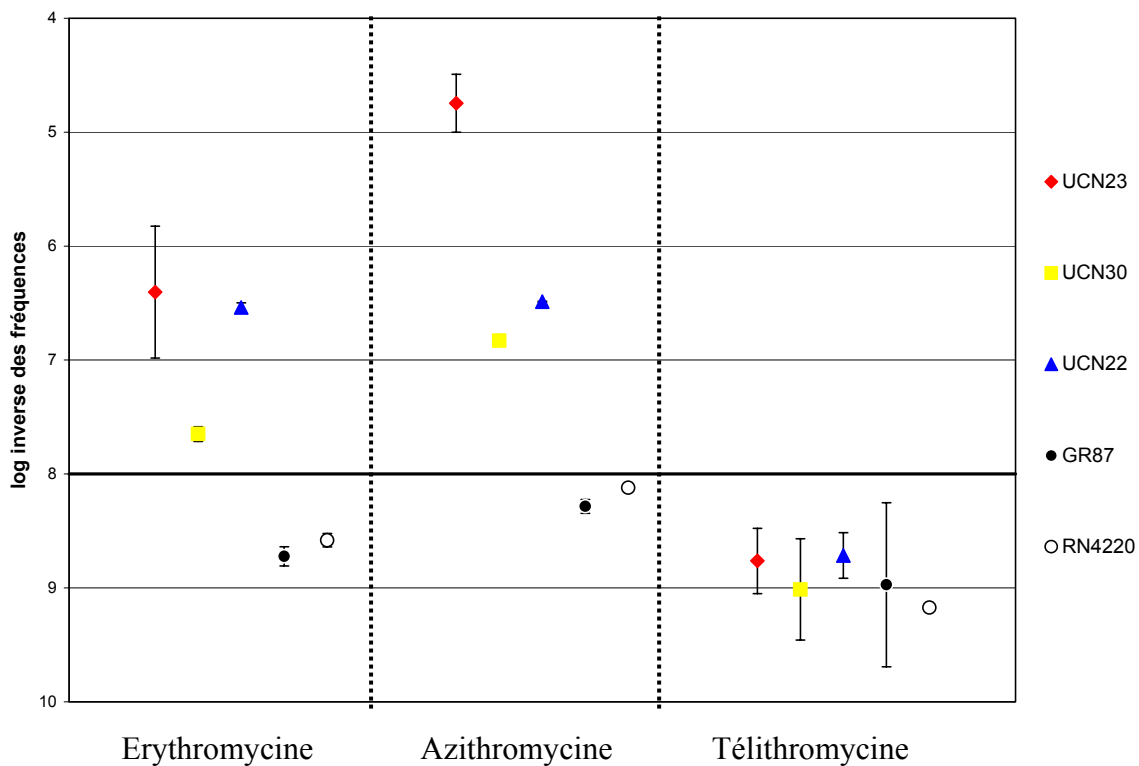
Nous avons analysé les profils de résistance aux macrolides des souches isolées de mucoviscidose dont les fréquences de mutation ont été déterminées dans l'article 3. Sur les 89 souches testées, 13 ont été classées dans le groupe « mutateur ». Parmi les souches non mutatrices, 50% présentaient une résistance ou une sensibilité intermédiaire à l'érythromycine, tandis que parmi les mutateurs, 76,9% présentaient une résistance ou une sensibilité intermédiaire à l'érythromycine. Ces résultats représentent une différence significative entre les deux groupes ( $p < 0,05$  ; test de Fisher) nous permettant d'affirmer que les mutateurs sont plus fréquemment résistants aux macrolides. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la proportion de souches résistantes dans ce groupe de souches isolées de mucoviscidose, qui atteint 54%, est largement supérieure à celle observée dans la population générale de *S. aureus* isolés au CHU de Caen pendant la même période, qui est situé autour de 38%. Cette observation montre donc une tendance générale à l'acquisition de résistance aux macrolides chez les *S. aureus* isolés de mucoviscidose.

### 2) Sélection de la résistance par les macrolides et effet sélecteur de la télithromycine

Nous avons étudié le comportement vis-à-vis des macrolides de 3 souches hypermutables sensibles à ces antibiotiques (UCN22, UCN23 et UCN30) en comparaison avec une souche non mutatrice isolée de mucoviscidose (GR87) et la souche de référence *S. aureus* RN4220. Les fréquences de mutation de ces 5 souches ont été déterminées sur érythromycine, azithromycine et télithromycine sur des milieux contenant des concentrations d'antibiotiques allant de 4 à 8 fois la CMI des souches pour ces antibiotiques. Les mesures ont été répétées en double ou en triple pour chaque souche. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 25**. On voit que les fréquences de mutations moyennes des souches mutatrices sur érythromycine et azithromycine sont bien supérieures à celles obtenues avec les non mutatrices. L'érythromycine et l'azithromycine sélectionnent donc la résistance à des fréquences élevées chez les souches mutatrices par rapport aux non mutatrices. De plus, on constate que la télithromycine est beaucoup moins sélectionnante que les macrolides, puisque les fréquences de mutation moyenne des souches mutatrices sur cet antibiotique sont proches de celles observées chez les souches témoins. Cette différence pourrait être due à l'affinité

augmentée de la télithromycine pour les ribosomes bactériens (dont le mécanisme n'est pas encore éclairci) même lorsque ceux-ci présentent des mutations (Etude bibliographique, chapitre II.C.2.a, page 59).

Ces résultats confirment le lien établi dans l'article 3 entre hypermutabilité des souches et résistance aux macrolides chez *S. aureus*. De plus, ils appuient l'idée que l'utilisation d'antibiotiques moins sélectionnants pourrait être un frein à l'apparition de résistance par mutation.



**Figure 25.** Fréquences de mutation comparées de souches mutatrices (UCN23, UCN30 et UCN22) et non mutatrices (GR87 et RN4220) sur érythromycine, azithromycine et télithromycine. Les valeurs correspondent au logarithme inverse des fréquences de mutation, les barres d'erreurs représentent la déviation standard.

## **DISCUSSION ET CONCLUSION**

Ce travail nous a permis de montrer que l'émergence de la résistance aux macrolides chez les souches *S. aureus* isolées chez les patients atteints de mucoviscidose se faisait majoritairement grâce à l'accumulation de mutations ribosomales qui n'avaient jamais été décrites jusque là dans le genre staphylocoque. Nous avons en effet mis en évidence des mutations dans les domaines V et II de l'ARNr 23S, ainsi que dans les protéines ribosomales L4 et L22, dont beaucoup sont connues pour conférer la résistance à ces antibiotiques chez d'autres espèces bactériennes. Ces résultats viennent donc appuyer ceux qui ont été obtenus par ailleurs et présentent un intérêt pour confirmer la structure du site d'action des macrolides et les nucléotides importants pour la fixation de ces antibiotiques sur le ribosome.

Ces observations pourraient être liées à l'utilisation depuis quelques années de l'azithromycine dans la mucoviscidose pour ses effets indirects contre l'adhésion bactérienne et le processus inflammatoire, et elles sont à mettre en corrélation avec un pourcentage inhabituellement élevé de résistance aux macrolides chez les souches de *S. aureus* isolées de mucoviscidose au CHU de Caen.

Nous avons également montré que chez cette espèce qui possède 5 à 6 copies du gène *rrl* codant l'ARNr 23S, les souches qui présentaient les mutations aux positions 2058 et 2059 étaient mutées sur au moins 3 des copies présentes dans le chromosome. Ces résultats confirment ceux qui ont été rapportés chez *S. pneumoniae*, qui possède 4 copies de *rrl*, et où les souches résistantes par mutation présentent toujours au moins 2 copies altérées. Cette nécessité d'accumuler des mutations sur au moins la moitié des copies du gène *rrl* pourrait expliquer pourquoi des organismes comme *S. aureus* qui possèdent un nombre relativement important de copies n'acquièrent pas fréquemment ce type de résistance.

Cette importance des mécanismes de résistance par mutation des gènes ribosomiaux chez les souches de *S. aureus* isolées de mucoviscidose pourrait s'expliquer par l'observation que nous avons faite d'une plus grande proportion de souches hypermutables chez les patients atteints de cette maladie en comparaison avec d'autres pathologies. D'ailleurs, nous avons montré que des souches hypermutables sensibles aux macrolides présentaient *in vitro* une fréquence de mutation élevée sur l'azithromycine et l'érythromycine par rapport à des témoins non mutateurs. De plus, d'autres travaux réalisés au laboratoire et rapportés dans l'article présenté en annexe de ce mémoire ont aussi montré que les souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques de la famille des quinolones étaient plus fréquemment hypermutables que les souches sensibles (5/50 souches mutatrices contre 0/74 dans le groupe de témoins sensibles).

Depuis quelques années, l'accumulation des études *in vitro* sur la relation entre l'hypermutable de certains pathogènes et l'émergence de résistances aux antibiotiques mettaient en évidence un risque potentiel fort (Chopra *et al.*, 2003 ; Blazquez, 2003). Cependant, c'est la première fois qu'une relation directe entre l'hypermutable des souches et l'acquisition de résistance aux antibiotiques par mutation *in vivo* a pu être montrée. Ces résultats confirment que l'utilisation de stratégies thérapeutiques combinant l'utilisation de plusieurs antibiotiques doit être envisagée pour éviter l'émergence de clones mutateurs favorisant l'apparition de mutants résistants.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait qu'il existe relativement plus de souches mutatrices dans le cadre de la mucoviscidose que dans d'autres infections. D'une part, on pourrait penser que ce caractère est spécifique aux souches isolées de cette maladie. Cependant, cette hypothèse est peu probable, puisque plusieurs études ont montré qu'il existe des mutateurs dans autres infections chroniques comme, par exemple, les infections urinaires (Denamur *et al.*, 2002). On peut donc plutôt supposer que la présence de mutateurs est une conséquence de la co-sélection de ces souches avec les mutations adaptatives nécessaires à la survie sur le long terme dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose, comme par exemple les mutations conférant une résistance aux antibiotiques. À l'appui de cette hypothèse, nos résultats de séquençage de portions très conservées de gènes domestiques chez quelques souches accumulant de nombreuses mutations ribosomales montrent que même les gènes qui ne sont pas des cibles pour les antibiotiques mais sont impliqués dans la réponse au stress et l'adhésion peuvent être touchés.

Au vu de nos résultats et de ceux décrits dans la littérature, on peut se demander si les infections chroniques ne seraient pas particulièrement propices à la sélection de souches hypermutables. Cependant, une étude réalisée au sein de notre laboratoire sur des souches de *S. aureus* isolées d'infections chroniques osseuses n'a pas permis de montrer une prévalence des souches hypermutables dans cette pathologie (N'Guyen et Leclercq, communication personnelle). L'autre explication serait que, au contraire, c'est le processus d'infection aiguë qui limite la présence de souches hypermutables, par exemple parce que ces souches sont moins virulentes, comme une étude l'a montré pour *L. monocytogenes* (Merino *et al.*, 2002). Un travail récent portant sur le rôle du phénotype mutateur de *S. aureus* dans les infections chroniques osseuses chez le rat montre également que les souches mutatrices sont plutôt désavantagées dans cette pathologie, leur virulence semblant diminuée, mais qu'en présence d'un traitement antibiotique de longue durée, la tendance s'inverse pour donner l'avantage au

mutateur (Daurel et Fantin, communication personnelle). On peut donc finalement penser que les pathogènes, soumis aux pressions combinées du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques administrés aux malades, présentent un taux de mutation plus élevé du fait de l'obligation d'adaptation à l'environnement à laquelle ils sont soumis.

Nous nous sommes également penchés sur les causes possibles du phénotype hypermutable détecté chez nos souches, ce qui nous a amené à étudier le SRM chez *S. aureus*, et en particulier, les gènes *mutS* et *mutL*. Une première approche *in silico* ayant montré que les deux gènes étaient adjacents et dans la même orientation sur le chromosome de *S. aureus*, nous avons vérifié par RT-PCR que tous deux appartenaient bien à un même opéron, et que l'inactivation du premier gène, *mutS*, n'entraînerait pas d'effet polaire sur les suivants (*mutL* et *glpP*). Nous avons également pu constater que ces deux gènes étaient assez bien conservés au sein de l'espèce et nous avons donc réalisé le séquençage complet de *mutSL* chez 11 isolats hypermutables. Plusieurs altérations de ces structures ont ainsi été mises en évidence et nous avons vérifié par des expériences de complémentation de souches sauvages ou inactivées dans l'un ou l'autre des gènes, d'une part, que tous deux étaient bien impliqués dans l'hypermutabilité chez *S. aureus*, et d'autre part, que chez 4 de nos souches hypermutables, ce phénotype pouvait être mis en relation avec ces altérations. Chez les autres souches hypermutables, d'autres structures sont sans doute impliquées. On sait par exemple que chez *E. coli* une régulation atypique du système SOS peut être responsable de l'augmentation de la fréquence de mutation de certaines souches dans certaines conditions (Radman, 1999 ; Bjedov *et al.*, 2003). D'autres gènes mutateurs ont par ailleurs été identifiés chez *B. subtilis* (Sasaki *et al.*, 2000) et certains ont des homologues chez *S. aureus*.

Chez deux souches, le gène *mutS* n'a pu être détecté par PCR et son absence a été confirmée par une analyse du génome entier en Southern blot, alors qu'elles ne présentaient pas une fréquence de mutation différente des témoins. De plus, ces souches accumulent de nombreuses mutations ribosomales de signification inconnue alors qu'elles possèdent déjà un gène de résistance acquis et ce sont elles qui présentent le plus d'altérations des gènes domestiques *sodA* et *spa*. Ces souches pourraient donc représenter l'étape ultime de l'évolution du staphylocoque dans l'histoire naturelle de la colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose. Après avoir acquis les mutations (ou ici en l'occurrence, le gène de résistance) nécessaires à leur survie, on pense en effet que la plupart des mutateurs finissent par revenir à un phénotype sauvage leur évitant d'accumuler des mutations coûteuses (de Visser, 2002). Cependant, le gène *mutS* étant indétectable chez nos souches, on ne peut

pas supposer que leur retour à un état non mutateur se soit fait par réacquisition du gène fonctionnel grâce à un transfert horizontal, comme cela semble être le cas pour la plupart des mutateurs (Denamur *et al.*, 2000). Ces souches semblent donc indiquer qu'il existe d'autres mécanismes inconnus à ce jour permettant de compenser la perte d'un SRM fonctionnel chez *S. aureus*.

Nous avons observé une association constante sur une même copie du gène *rrl* de plusieurs mutations adjacentes. Cela laissait supposer que le mécanisme principal conduisant à l'expression de la résistance aux macrolides par mutation chez *S. aureus* résidait dans la mutation initiale d'une copie du gène suivie de la duplication de cette mutation par recombinaison homologue permettant sa dissémination sur les autres copies présentes dans le chromosome bactérien. Ces résultats nous ont donc poussés à construire un modèle *in vitro* permettant d'étudier l'implication des gènes *mutS* et *mutL* dans la recombinaison chez *S. aureus*, qui semble montrer que tous deux n'ont qu'un effet limité dans la prévention du phénomène chez cette espèce. On peut donc supposer que d'autres mécanismes entrent en jeu afin de contrôler la recombinaison entre fragments d'ADN non parfaitement homologues chez *S. aureus*. Ainsi, on sait que chez *E. coli* le phénomène est également sous le contrôle régulateur du système SOS (Matic *et al.*, 1996). D'autre part, il a été montré chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae* que ce contrôle se faisait également par le biais de la nécessité d'une homologie forte entre les extrémités du fragment d'ADN étranger et l'ADN cible de la recombinaison (Majewski et Cohan, 1999 ; Majewski *et al.*, 2000).

Ce travail devra être poursuivi en recherchant d'autres gènes mutateurs chez cette espèce, soit par inactivation ciblée de candidats identifiés *in silico* par comparaison avec d'autres espèces comme *B. subtilis*, soit par inactivation au hasard en criblant les transformants pour leur capacité à recombiner ou à muter plus facilement.

*S. aureus*, à l'instar d'autres espèces comme *S. pneumoniae* ou *H. influenzae*, est une bactérie à la fois commensale et pathogène, plus fréquemment retrouvée chez les individus sains et asymptomatiques que dans les infections. Pour ces bactéries, la maladie est en fait un cul de sac : la virulence diminue le laps de temps pendant lequel la transmission à de nouveaux hôtes est possible. Il semble qu'en fait l'expression des facteurs de pathogénicité ne soit qu'un effet secondaire de l'adaptation de ces bactéries à des changements de l'environnement (Meyers *et al.*, 2003). Il a été montré récemment que les souches de *S. aureus* pouvaient présenter des divergences et une hétérogénéité importantes dans leurs structures chromosomiques, conduisant à la survenue de souches particulièrement

dangereuses portant de nombreuses caractéristiques de virulence et de résistances aux antibiotiques grâce au grand nombre de répétitions chromosomiques qu'elles présentent dans leur génome, leur permettant de générer des réorganisations génétiques importantes (Holden *et al.*, 2004 ; Lindsay et Holden, 2004). Ce problème pourrait être particulièrement pertinent dans un contexte de recombinaison illégitime favorisé par un phénotype mutateur. L'étude de l'évolution génomique de souches pathogènes hypermutables ou non pourrait dans ce cadre apporter plus d'informations sur la relation possible entre les deux phénomènes. La comparaison de données phylogénétiques de souches pathogènes et commensales pourrait également apporter des informations permettant de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'évolution du génome chez cette espèce.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Achour,W., Guenni,O., Malbruny,B., Canu,A., Leclercq,R., and Hassen,A.B. (2004). Phenotypic and molecular characterization of macrolide and streptogramin resistance in *Streptococcus mitis* from neutropenic patients. *J Antimicrob. Chemother.*, **54**, 117-121.
- Ackermann,G. and Rodloff,A.C. (2003). Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647)--the first ketolide. *J Antimicrob. Chemother.*, **51**, 497-511.
- Adachi,T. and Morimoto,S. (2002). Clarithromycin and new derivatives of erythromycin. In Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 53-72.
- Alani,E., Reenan,R.A., and Kolodner,R.D. (1994). Interaction between mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **137**, 19-39.
- Allen,D.J., Makhov,A., Grilley,M., Taylor,J., Thresher,R., Modrich,P., and Griffith,J.D. (1997). MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J.*, **16**, 4467-4476.
- Allen,N.E. (2002). Effects of macrolide antibiotics on ribosome function. In Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 261-280.
- Allignet,J., Loncle,V., and el Sohl,N. (1992). Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene*, **117**, 45-51.
- Allignet,J., Aubert,S., Morvan,A., and El Solh,N. (1996). Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among *staphylococci* resistant to these antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2523-2528.
- Allignet,J. and El Solh,N. (1997). Characterization of a new staphylococcal gene, *vgaB*, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Gene*, **202**, 133-138.
- Alonso,A., Campanario,E., and Martinez,J.L. (1999). Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **145 ( Pt 10)**, 2857-2862.
- Asai,T., Condon,C., Voulgaris,J., Zaporjets,D., Shen,B., Al Omar,M., Squires,C., and Squires,C.L. (1999). Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operons. *J. Bacteriol.*, **181**, 3803-3809.
- Balganesh,T.S. and Lacks,S.A. (1985). Heteroduplex DNA mismatch repair system of *Streptococcus pneumoniae*: cloning and expression of the *hexA* gene. *J Bacteriol.*, **162**, 979-984.
- Ban,C. and Yang,W. (1998a). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell*, **95**, 541-552.
- Ban,C. and Yang,W. (1998b). Structural basis for MutH activation in *E.coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *EMBO J.*, **17**, 1526-1534.

- Ban,C., Junop,M., and Yang,W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell*, **97**, 85-97.
- Ban,N., Nissen,P., Hansen,J., Moore,P.B., and Steitz,T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.
- Bartkus,J.M., Juni,B.A., Ehresmann,K., Miller,C.A., Sanden,G.N., Cassidy,P.K., Saubolle,M., Lee,B., Long,J., Harrison,A.R., Jr., and Besser,J.M. (2003). Identification of a mutation associated with erythromycin resistance in *Bordetella pertussis*: implications for surveillance of antimicrobial resistance. *J Clin. Microbiol.*, **41**, 1167-1172.
- Baumert,N., von Eiff,C., Schaaff,F., Peters,G., Proctor,R.A., and Sahl,H.G. (2002). Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb Drug Resist*, **8**, 253-260.
- Beaber,J.W., Hochhut,B., and Waldor,M.K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, **427**, 72-74.
- Beringer,M., Adio,S., Wintermeyer,W., and Rodnina,M. (2003). The G2447A mutation does not affect ionization of a ribosomal group taking part in peptide bond formation. *RNA*, **9**, 919-922.
- Berisio,R., Harms,J., Schluenzen,F., Zarivach,R., Hansen,H.A., Fucini,P., and Yonath,A. (2003). Structural insight into the antibiotic action of telithromycin against resistant mutants. *J. Bacteriol.*, **185**, 4276-4279.
- Bingen,E., Leclercq,R., Fitoussi,F., Brahimi,N., Malbruny,B., Deforche,D., and Cohen,R. (2002). Emergence of group A *streptococcus* strains with different mechanisms of macrolide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1199-1203.
- Biswas,I., Obmolova,G., Takahashi,M., Herr,A., Newman,M.A., Yang,W., and Hsieh,P. (2001). Disruption of the helix-u-turn-helix motif of MutS protein: loss of subunit dimerization, mismatch binding and ATP hydrolysis. *J. Mol. Biol.*, **305**, 805-816.
- Bjedov,I., Tenaillon,O., Gerard,B., Souza,V., Denamur,E., Radman,M., Taddei,F., and Matic,I. (2003). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science*, **300**, 1404-1409.
- Bjorkman,J., Nagaev,I., Berg,O.G., Hughes,D., and Andersson,D.I. (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*, **287**, 1479-1482.
- Blazquez,J. (2003). Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin. Infect. Dis.*, **37**, 1201-1209.
- Blondeau,J.M. (2002). The evolution and role of macrolides in infectious diseases. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **3**, 1131-1151.
- Blondeau,J.M. and Sanche,S.E. (2002). Quinupristin/dalfopristin. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **3**, 1341-1364.
- Bonfiglio,G. and Furneri,P.M. (2001). Novel streptogramin antibiotics. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **10**, 185-198.

- Bozdogan,B., Esel,D., Whitener,C., Browne,F.A., and Appelbaum,P.C. (2003). Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J Antimicrob. Chemother.*, **52**, 864-868.
- Bresler,S.E., Kreneva,R.A., and Kushev,V.V. (1968). Correction of molecular heterozygotes in the course of transformation. *Mol. Gen. Genet.*, **102**, 257-268.
- Brisson-Noel,A., Delrieu,P., Samain,D., and Courvalin,P. (1988). Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *J Biol. Chem.*, **263**, 15880-15887.
- Brock,T.D. and Brock,M.L. (1959). Similarity in mode of action of chloramphenicol and erythromycin. *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 274-275.
- Brown,E.W., LeClerc,J.E., Li,B., Payne,W.L., and Cebula,T.A. (2001). Phylogenetic evidence for horizontal transfer of *mutS* alleles among naturally occurring *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.*, **183**, 1631-1644.
- Bryskier,A., Agouridas,C., and Gasc,J.C. (1993). Classification of macrolide antibiotics. In Bryskier,A., Butzler,J.P., Neu,H.C., and Tulkens,P.M. (Eds.), *Macrolides : chemistry, pharmacology and clinical uses*, arnette blackwell, Paris, pp. 5-66.
- Bryskier,A. (1999a). Lincosamines. In Bryskier,A. (Ed.), *Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques*, Ellipses, Paris, pp. 616-632.
- Bryskier,A. (1999b). Streptogramines. In Bryskier,A. (Ed.), *Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques*, Ellipses, Paris, pp. 595-615.
- Bryskier,A. and Denis,A. (2002). Ketolides: novel antibacterial agents designed to overcome resistance to erythromycin A within Gram-positive cocci. In Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 97-140.
- Burman,W.J., Stone,B.L., Brown,B.A., Wallace,R.J., Jr., and Bottger,E.C. (1998). AIDS-related *Mycobacterium kansasii* infection with initial resistance to clarithromycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 369-371.
- Butler,J.C., Lennox,J.L., McDougal,L.K., Sutcliffe,J.A., Tait-Kamradt,A., and Tenover,F.C. (2003). Macrolide-resistant pneumococcal endocarditis and epidural abscess that develop during erythromycin therapy. *Clin. Infect. Dis.*, **36**, e19-e25.
- Buxbaum,A., Forsthuber,S., Graninger,W., and Georgopoulos,A. (2003). Comparative activity of telithromycin against typical community-acquired respiratory pathogens. *J Antimicrob. Chemother.*, **52**, 371-374.
- Cairns,J., Overbaugh,J., and Miller,S. (1988). The origin of mutants. *Nature*, **335**, 142-145.
- Canu,A. and Leclercq,R. (2001). Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.*, **1**, 215-225.
- Canu,A., Malbruny, B., Slaoui, M., Coquemont, M., Haristoy, X., Lozniewski, A., and Leclercq, R. (2001) Clinical isolates of *Streptococcus oralis* and Group G *Streptococcus*

resistant to streptogramins with mutation of L4 ribosomal protein. *In program and abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, USA, abst. 1815:101.*

Canu,A., Malbruny,B., Coquemont,M., Davies,T.A., Appelbaum,P.C., and Leclercq,R. (2002). Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to macrolides, clindamycin, streptogramin, and telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 125-131.

Canu,A., Abbas,A., Malbruny,B., Sichel,F., and Leclercq,R. (2004). Denaturing high-performance liquid chromatography detection of ribosomal mutations conferring macrolide resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 297-304.

Carfartan,G., Gerardin,P., Turck,D., and Husson,M.O. (2004). Effect of subinhibitory concentrations of azithromycin on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to bronchial mucins collected from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, 686-688.

Champney,W.S., Tober,C.L., and Burdine,R. (1998). A comparison of the inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by nine different macrolide antibiotics. *Curr. Microbiol.*, **37**, 412-417.

Champney,W.S. and Tober,C.L. (2000). Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. *Curr. Microbiol.*, **41**, 126-135.

Charlesworth,D., Charlesworth,B., and Bull,J. (1988). Origins of mutants disputed. *Nature*, **335**, 142.

Chittum,H.S. and Champney,W.S. (1994). Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **176**, 6192-6198.

Chittum,H.S. and Champney,W.S. (1995). Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.*, **30**, 273-279.

Chopra,I., O'Neill,A.J., and Miller,K. (2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat.*, **6**, 137-145.

Clarebout,G., Nativelle,E., and Leclercq,R. (2001). Unusual inducible cross resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B by methylase production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.*, **7**, 317-322.

Clarebout,G. and Leclercq,R. (2002). Fluorescence assay for studying the ability of macrolides to induce production of ribosomal methylase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2269-2272.

Clark,C., Bozdogan,B., Peric,M., Dewasse,B., Jacobs,M.R., and Appelbaum,P.C. (2002). *In vitro* selection of resistance in *Haemophilus influenzae* by amoxicillin-clavulanate, cefpodoxime, cefprozil, azithromycin, and clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2956-2962.

- Claverys, J.P., Prats, H., Vasseghi, H., and Gherardi, M. (1984). Identification of *Streptococcus pneumoniae* mismatch repair genes by an additive transformation approach. *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 91-96.
- Claverys, J.P. and Lacks, S.A. (1986). Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **50**, 133-165.
- Clements, M.O., Watson, S.P., and Foster, S.J. (1999). Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.*, **181**, 3898-3903.
- Cox, E.C. (1976). Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.*, **10**, 135-156.
- Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M., and Jinks-Robertson, S. (1997). Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 9757-9762.
- Davydova, N., Streltsov, V., Wilce, M., Liljas, A., and Garber, M. (2002). L22 ribosomal protein and effect of its mutation on ribosome resistance to erythromycin. *J. Mol. Biol.*, **322**, 635-644.
- de Visser, J.A. (2002). The fate of microbial mutators. *Microbiology*, **148**, 1247-1252.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te, R.H. (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell*, **82**, 321-330.
- Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenailon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M., and Matic, I. (2000). Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell*, **103**, 711-721.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F., and Matic, I. (2002). High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol.*, **184**, 605-609.
- Depardieu, F. and Courvalin, P. (2001). Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16-membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 319-323.
- Doktor, S.Z., Shortridge, V.D., Beyer, J.M., and Flamm, R.K. (2004). Epidemiology of macrolide and/or lincosamide resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with ribosomal mutations. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **49**, 47-52.
- Douthwaite, S. (1992). Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. *J. Bacteriol.*, **174**, 1333-1338.
- Douthwaite, S. and Aagaard, C. (1993). Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alterations in the 23 S rRNA peptidyl transferase loop. *J. Mol. Biol.*, **232**, 725-731.

Douthwaite,S., Hansen,L.H., and Mauvais,P. (2000). Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. *Mol. Microbiol.*, **36**, 183-193.

Douthwaite,S. (2001). Structure-activity relationships of ketolides vs. macrolides. *Clin. Microbiol. Infect.*, **7** (Suppl 3), 11-17.

Douthwaite,S. and Champney,W.S. (2001). Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J. Antimicrob. Chemother.*, **48** (Suppl T1), 1-8.

Dutta,R. and Inouye,M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 24-28.

Eisen,J.A. and Hanawalt,P.C. (1999). A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.*, **435**, 171-213.

Ephrussi-Taylor,H. and Gray,T.C. (1966). Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation. *J Gen. Physiol*, **49**, 211-231.

Ettayebi,M., Prasad,S.M., and Morgan,E.A. (1985). Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **162**, 551-557.

Fabisiewicz,A. and Worth,L., Jr. (2001). *Escherichia coli* MutS,L modulate RuvAB-dependent branch migration between diverged DNA. *J Biol. Chem.*, **276**, 9413-9420.

Farrell,D.J., Douthwaite,S., Morrissey,I., Bakker,S., Poehlsgaard,J., Jakobsen,L., and Felmingham,D. (2003). Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999-2000 study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1777-1783.

Farrell,D.J., Morrissey,I., Bakker,S., Buckridge,S., and Felmingham,D. (2004). *In vitro* activities of telithromycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance due to ribosomal mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3169-3171.

Feinstein,S.I. and Low,K.B. (1986). Hyper-recombining recipient strains in bacterial conjugation. *Genetics*, **113**, 13-33.

Feng,G., Tsui,H.C., and Winkler,M.E. (1996). Depletion of the cellular amounts of the MutS and MutH methyl-directed mismatch repair proteins in stationary-phase *Escherichia coli* K-12 cells. *J. Bacteriol.*, **178**, 2388-2396.

Fernandez-Munoz,R., Monro,R.E., Torres-Pinedo,R., and Vazquez,D. (1971). Substrate- and antibiotic-binding sites at the peptidyl-transferase centre of *Escherichia coli* ribosomes. Studies on the chloramphenicol, lincomycin and erythromycin sites. *Eur. J Biochem.*, **23**, 185-193.

Fontana,C., Favaro,M., Minelli,S., Criscuolo,A.A., Pietroiusti,A., Galante,A., and Favalli,C. (2002). New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3765-3769.

- Foster,P.L. and Cairns,J. (1992). Mechanisms of directed mutation. *Genetics*, **131**, 783-789.
- Funchain,P., Yeung,A., Stewart,J.L., Lin,R., Slupska,M.M., and Miller,J.H. (2000). The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics*, **154**, 959-970.
- Furneri,P.M., Rappazzo,G., Musumarra,M.P., Di Pietro,P., Catania,L.S., and Roccasalva,L.S. (2001). Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2958-2960.
- Gabashvili,I.S., Gregory,S.T., Valle,M., Grassucci,R., Worbs,M., Wahl,M.C., Dahlberg,A.E., and Frank,J. (2001). The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol. Cell*, **8**, 181-188.
- Garza-Ramos,G., Xiong,L., Zhong,P., and Mankin,A. (2001). Binding site of macrolide antibiotics on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA. *J. Bacteriol.*, **183**, 6898-6907.
- Ginetti,F., Perego,M., Albertini,A.M., and Galizzi,A. (1996). *Bacillus subtilis* *mutS* *mutL* operon: identification, nucleotide sequence and mutagenesis. *Microbiology*, **142**, 2021-2029.
- Giraud,A., Matic,I., Tenaillon,O., Clara,A., Radman,M., Fons,M., and Taddei,F. (2001a). Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, **291**, 2606-2608.
- Giraud,A., Radman,M., Matic,I., and Taddei,F. (2001b). The rise and fall of mutator bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 582-585.
- Giraud,A., Matic,I., Radman,M., Fons,M., and Taddei,F. (2002). Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 863-865.
- Gobel,U., Butler,G.H., and Stanbridge,E.J. (1984). Comparative analysis of *mycoplasma* ribosomal RNA operons. *Isr. J Med. Sci.*, **20**, 762-764.
- Gregory,S.T. and Dahlberg,A.E. (1999a). Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **289**, 827-834.
- Gregory,S.T. and Dahlberg,A.E. (1999b). Mutations in the conserved P loop perturb the conformation of two structural elements in the peptidyl transferase center of 23 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1475-1483.
- Gross,M.D. and Siegel,E.C. (1981). Incidence of mutator strains in *Escherichia coli* and coliforms in nature. *Mutat. Res.*, **91**, 107-110.
- Guex,N. and Peitsch,M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gustafsson,I., Sjolund,M., Torell,E., Johannesson,M., Engstrand,L., Cars,O., and Andersson,D.I. (2003). Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance



are enriched in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. *J Antimicrob. Chemother.*, **52**, 645-650.

Gutierrez,O., Juan,C., Perez,J.L., and Oliver,A. (2004). Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3573-3575.

Haber,L.T., Pang,P.P., Sobell,D.I., Mankovich,J.A., and Walker,G.C. (1988). Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium mutS* gene required for mismatch repair: homology of MutS and HexA of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.*, **170**, 197-202.

Hall,B.G. (1990). Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics*, **126**, 5-16.

Hall,M.C., Jordan,J.R., and Matson,S.W. (1998). Evidence for a physical interaction between the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair proteins MutL and UvrD. *EMBO J.*, **17**, 1535-1541.

Hansen,J.L., Ippolito,J.A., Ban,N., Nissen,P., Moore,P.B., and Steitz,T.A. (2002). The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell*, **10**, 117-128.

Hansen,L.H., Mauvais,P., and Douthwaite,S. (1999). The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA. *Mol. Microbiol.*, **31**, 623-631.

Hao,Q., Li,Y., Zhang,Z.J., Liu,Y., and Gao,H. (2004). New mutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. *World J Gastroenterol.*, **10**, 1075-1077.

Harms,J.M., Schlunzen,F., Fucini,P., Bartels,H., and Yonath,A. (2004). Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalfoipristin and quinupristin. *BMC. Biol.*, **2**, 4.

Hashimoto,J.G., Stevenson,B.S., and Schmidt,T.M. (2003). Rates and Consequences of Recombination between rRNA Operons. *J. Bacteriol.*, **185**, 966-972.

Holden,M.T., Feil,E.J., Lindsay,J.A., Peacock,S.J., Day,N.P., Enright,M.C., Foster,T.J., Moore,C.E., Hurst,L., Atkin,R., Barron,A., Bason,N., Bentley,S.D., Chillingworth,C., Chillingworth,T., Churcher,C., Clark,L., Corton,C., Cronin,A., Doggett,J., Dowd,L., Feltwell,T., Hance,Z., Harris,B., Hauser,H., Holroyd,S., Jagels,K., James,K.D., Lennard,N., Line,A., Mayes,R., Moule,S., Mungall,K., Ormond,D., Quail,M.A., Rabinowitsch,E., Rutherford,K., Sanders,M., Sharp,S., Simmonds,M., Stevens,K., Whitehead,S., Barrell,B.G., Spratt,B.G., and Parkhill,J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9786-9781.

Horst,J.P., Wu,T.H., and Marinus,M.G. (1999). *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.*, **7**, 29-36.

Hsieh,P. (2001). Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat. Res.*, **486**, 71-87.

- Hulten,K., Gibreel,A., Skold,O., and Engstrand,L. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2550-2553.
- Humbert,O., Prudhomme,M., Hakenbeck,R., Dowson,C.G., and Claverys,J.P. (1995). Homeologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*: saturation of the Hex mismatch repair system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **92**, 9052-9056.
- Jalava,J., Vaara,M., and Huovinen,P. (2004). Mutation at the position 2058 of the 23S rRNA as a cause of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **3**, 5.
- Jamal,M.A., Maeda,S., Nakata,N., Kai,M., Fukuchi,K., and Kashiwabara,Y. (2000). Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium* intracellulare complex. *Tuber. Lung Dis.*, **80**, 1-4.
- Jones,M., Wagner,R., and Radman,M. (1987). Repair of a mismatch is influenced by the base composition of the surrounding nucleotide sequence. *Genetics*, **115**, 605-610.
- Jones,R.N., Farrell,D.J., and Morrissey,I. (2003). Quinupristin-dalfopristin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: novel L22 ribosomal protein mutation in two clinical isolates from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2696-2698.
- Joshi,A. and Rao,B.J. (2001). MutS recognition: multiple mismatches and sequence context effects. *J. Biosci.*, **26**, 595-606.
- Jung,K.Y., Cha,J.D., Lee,S.H., Woo,W.H., Lim,D.S., Choi,B.K., and Kim,K.J. (2001). Involvement of staphylococcal protein A and cytoskeletal actin in *Staphylococcus aureus* invasion of cultured human oral epithelial cells. *J Med. Microbiol.*, **50**, 35-41.
- Junop,M.S., Obmolova,G., Rausch,K., Hsieh,P., and Yang,W. (2001). Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol. Cell*, **7**, 1-12.
- Junop,M.S., Yang,W., Funchain,P., Clendenin,W., and Miller,J.H. (2003). *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 387-405.
- Jyssum,K. (1960). Observations on two types of genetic instability in *Escherichia coli*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **48**, 113-120.
- Kahl,B., Herrmann,M., Everding,A.S., Koch,H.G., Becker,K., Harms,E., Proctor,R.A., and Peters,G. (1998). Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1023-1029.
- Kerem,B., Rommens,J.M., Buchanan,J.A., Markiewicz,D., Cox,T.K., Chakravarti,A., Buchwald,M., and Tsui,L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, **245**, 1073-1080.
- Kimura,M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**, 624-626.

- Kirst,H. (2002). Introduction to the macrolide antibiotics. *In* Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 1-14.
- Kolodner,R. (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev.*, **10**, 1433-1442.
- Kwak,J.H., Choi,E.C., and Weisblum,B. (1991). Transcriptional attenuation control of *ermK*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol.*, **173**, 4725-4735.
- Labro,M. (2002). Cellular accumulation of macrolide antibiotics. Intracellular bioactivity. *In* Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 37-52.
- Lacks,S. and Hotchkiss,R.D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 508-518.
- Lacks,S. (1970). Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *J Bacteriol.*, **101**, 373-383.
- Lacks,S.A., Dunn,J.J., and Greenberg,B. (1982). Identification of base mismatches recognized by the heteroduplex-DNA-repair system of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell*, **31**, 327-336.
- Lamers,M.H., Perrakis,A., Enzlin,J.H., Winterwerp,H.H., de Wind,N., and Sixma,T.K. (2000). The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature*, **407**, 711-717.
- Lamers,M.H., Georgijevic,D., Lebbink,J.H., Winterwerp,H.H., Agianian,B., de Wind,N., and Sixma,T.K. (2004). ATP increases the affinity between MutS ATPase domains; Implications for ATP hydrolysis and conformational changes. *J Biol. Chem.*
- LeClerc,J.E., Li,B., Payne,W.L., and Cebula,T.A. (1996). High mutations frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*, **274**, 1208-1211.
- Leclercq,R. and Courvalin,P. (1991). Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1273-1276.
- Lee,S.Y., Ning,Y., and Fenno,J.C. (2002). 23S rRNA point mutation associated with erythromycin resistance in *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **207**, 39-42.
- Lenski,R.E., Slatkin,M., and Ayala,F.J. (1989). Another alternative to directed mutation. *Nature*, **337**, 123-124.
- Lenski,R.E. (1992). Evolution, experimental. *In* Lederberg, Joshua (Ed.), *Encyclopedia of microbiology*, vol 2, Academic Press, pp. 125-140.
- Levin,B.R., Perrot,V., and Walker,N. (2000). Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*, **154**, 985-997.

- Li,B., Tsui,H.C., LeClerc,J.E., Dey,M., Winkler,M.E., and Cebula,T.A. (2003). Molecular analysis of *mutS* expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, **149**, 1323-1331.
- Lina,G., Quaglia,A., Reverdy,M.E., Leclercq,R., Vandenesch,F., and Etienne,J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1062-1066.
- Lindsay,J.A. and Holden,M.T. (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.*, **12**, 378-385.
- Livermore,D.M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.*, **36**, S11-S23.
- Loewe,L., Textor,V., and Scherer,S. (2003). High deleterious genomic mutation rate in stationary phase of *Escherichia coli*. *Science*, **302**, 1558-1560.
- Lopez de Saro,F.J. and O'Donnell,M. (2001). Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 8376-8380.
- Lucier,T.S., Heitzman,K., Liu,S.K., and Hu,P.C. (1995). Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2770-2773.
- Luria,S.E. and Delbrück,M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, **28**, 491-511.
- Lyczak,J.B., Cannon,C.L., and Pier,G.B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 194-222.
- Macia,M.D., Borrell,N., Perez,J.L., and Oliver,A. (2004). Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 2665-2672.
- Majewski,J. and Cohan,F.M. (1998). The effect of mismatch repair and heteroduplex formation on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, **148**, 13-18.
- Majewski,J. and Cohan,F.M. (1999). DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics*, **153**, 1525-1533.
- Majewski,J., Zawadzki,P., Pickerill,P., Cohan,F.M., and Dowson,C.G. (2000). Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J Bacteriol.*, **182**, 1016-1023.
- Malbruny,B., Canu,A., Bozdogan,B., Fantin,B., Zarrouk,V., Dutka-Malen,S., Feger,C., and Leclercq,R. (2002a). Resistance to Quinupristin-Dalfopristin Due to Mutation of L22 Ribosomal Protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2200-2207.
- Malbruny,B., Nagai,K., Coquemont,M., Bozdogan,B., Andrasevic,A.T., Hupkova,H., Leclercq,R., and Appelbaum,P.C. (2002b). Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 935-939.

- Mao,E.F., Lane,L., Lee,J., and Miller,J.H. (1997). Proliferation of mutators in A cell population. *J. Bacteriol.*, **179**, 417-422.
- Marshall,S.H., Donskey,C.J., Hutton-Thomas,R., Salata,R.A., and Rice L.B. (2002). Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3334-3336.
- Marsischky,G.T. and Kolodner,R.D. (1999). Biochemical characterization of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex and mispaired bases in DNA. *J Biol. Chem.*, **274**, 26668-26682.
- Marti,T.M., Kunz,C., and Fleck,O. (2002). DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J. Cell Physiol*, **191**, 28-41.
- Matic,I., Rayssiguier,C., and Radman,M. (1995). Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell*, **80**, 507-515.
- Matic,I., Taddei,F., and Radman,M. (1996). Genetic barriers among bacteria. *Trends Microbiol.*, **4**, 69-72.
- Matic,I., Radman,M., Taddei,F., Picard,B., Doit,C., Bingen,E., Denamur,E., and Elion,J. (1997). Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science*, **277**, 1833-1834.
- Matsuoka,M., Endou,K., Kobayashi,H., Inoue,M., and Nakajima,Y. (1998). A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**, 221-227.
- Matsuoka,M., Inoue,M., Nakajima,Y., and Endo,Y. (2002). New *erm* gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 211-215.
- Matsuoka,M., Inoue,M., Endo,Y., and Nakajima,Y. (2003). Characteristic expression of three genes, *msr*(A), *mph*(C) and *erm*(Y), that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**, 287-293.
- Mattoes,H. and Nightingale,C. (2002). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of macrolides. In Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 25-36.
- McCaffery,K., Olver,R.E., Franklin,M., and Mukhopadhyay,S. (1999). Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Thorax*, **54**, 380-383.
- Mechanic,L.E., Frankel,B.A., and Matson,S.W. (2000). *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. *J Biol. Chem.*, **275**, 38337-38346.
- Meier,A., Kirschner,P., Springer,B., Steingrube,V.A., Brown,B.A., Wallace,R.J., Jr., and Bottger,E.C. (1994). Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 381-384.
- Mejean,V., Devedjian,J.C., Rives,I., Alloing,G., and Claverys,J.P. (1991). Uracil-DNA glycosylase affects mismatch repair efficiency in transformation and bisulfite-induced mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5525-5531.

- Menninger,J.R. (1995). Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. *J Basic Clin. Physiol Pharmacol.*, **6**, 229-250.
- Merino,D., Reglier-Poupet,H., Berche,P., and Charbit,A. (2002). A hypermutator phenotype attenuates the virulence of *Listeria monocytogenes* in a mouse model. *Mol. Microbiol.*, **44**, 877-887.
- Metzgar,D. and Wills,C. (2000). Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. *Cell*, **101**, 581-584.
- Meyers,L.A., Levin,B.R., Richardson,A.R., and Stojiljkovic,I. (2003). Epidemiology, hypermutation, within-host evolution and the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **270**, 1667-1677.
- Miller,J.H. (1996). Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 625-643.
- Miller,J.H., Suthar,A., Tai,J., Yeung,A., Truong,C., and Stewart,J.L. (1999). Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **181**, 1576-1584.
- Miller,K., O'Neill,A.J., and Chopra,I. (2002). Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 925-934.
- Misyurina,O.Y., Chipitsyna,E.V., Finashutina,Y.P., Lazarev,V.N., Akopian,T.A., Savicheva,A.M., and Govorun,V.M. (2004). Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1347-1349.
- Miyake,T. (1960). Mutator factor in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, **45**, 11-14.
- Moazed,D. and Noller,H.F. (1987). Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie*, **69**, 879-884.
- Modrich,P. (1989). Methyl-directed DNA mismatch correction. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6597-6600.
- Modrich,P. and Lahue,R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 101-133.
- Morosini,M.I., Baquero,M.R., Sanchez-Romero,J.M., Negri,M.C., Galan,J.C., Del Campo,R., Perez-Diaz,J.C., and Baquero,F. (2003). Frequency of Mutation to Rifampin Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Strains: *hexA* and *hexB* Polymorphisms Do Not Account for Hypermutation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1464-1467.
- Mortier-Barriere,I., Humbert,O., Martin,B., Prudhomme,M., and Claverys,J.P. (1997). Control of recombination rate during transformation of *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Microb. Drug Resist.*, **3**, 233-242.

- Musher,D.M., Dowell,M.E., Shortridge,V.D., Flamm,R.K., Jorgensen,J.H., Le Magueres,P., and Krause,K.L. (2002). Emergence of macrolide resistance during treatment of pneumococcal pneumonia. *N. Engl. J Med.*, **346**, 630-631.
- Muthaiyan,A., Jayaswal,R.K., and Wilkinson,B.J. (2004). Intact *mutS* in laboratory-derived and clinical glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 623-625.
- Nagai,K., Davies,T.A., Dewasse,B.E., Pankuch,G.A., Jacobs,M.R., and Appelbaum,P.C. (2000). *In vitro* development of resistance to ceftriaxone, cefprozil and azithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob. Chemother.*, **46**, 909-915.
- Nagai,K., Appelbaum,P.C., Davies,T.A., Kelly,L.M., Hoellman,D.B., Andrasevic,A.T., Drukalska,L., Hryniewicz,W., Jacobs,M.R., Kolman,J., Miciuleviciene,J., Pana,M., Setchanova,L., Thege,M.K., Hupkova,H., Trupl,J., and Urbaskova,P. (2002). Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 *Pneumococci* from 10 central and Eastern European countries. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 371-377.
- Natrajan,G., Lamers,M.H., Enzlin,J.H., Winterwerp,H.H., Perrakis,A., and Sixma,T.K. (2003). Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4814-4821.
- Negri,M.C., Morosini,M.I., Baquero,M.R., Campo,R.R., Blazquez,J., and Baquero,F. (2002). Very low cefotaxime concentrations select for hypermutable *Streptococcus pneumoniae* populations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 528-530.
- Ng,L.K., Martin,I., Liu,G., and Bryden,L. (2002). Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3020-3025.
- Nikaido,H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.*, **178**, 5853-5859.
- Nissen,P., Hansen,J., Ban,N., Moore,P.B., and Steitz,T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920-930.
- Noller,H.F. and van Knippenberg,P.H. (1983). Structure and function of ribosomal RNA. *Horiz. Biochem. Biophys.*, **7**, 71-99.
- Novotny,G.W., Jakobsen,L., Andersen,N.M., Poehlsgaard,J., and Douthwaite,S. (2004). Ketolide Antimicrobial Activity Persists after Disruption of Interactions with Domain II of 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3677-3683.
- O'Neill,A.J. and Chopra,I. (2002). Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 161-169.
- O'Neill,A.J. and Chopra,I. (2003). Lack of evidence for involvement of hypermutability in emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1484-1485.

- Obmolova,G., Ban,C., Hsieh,P., and Yang,W. (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, **407**, 703-710.
- Occhialini,A., Urdaci,M., Doucet-Populaire,F., Bebear,C.M., Lamouliatte,H., and Megraud,F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2724-2728.
- Okazaki,N., Narita,M., Yamada,S., Izumikawa,K., Umetsu,M., Kenri,T., Sasaki,Y., Arakawa,Y., and Sasaki,T. (2001). Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol. Immunol.*, **45**, 617-620.
- Oleinick,N.L. and Corcoran,J.W. (1969). Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and -resistant *Bacillus subtilis* 168. *J Biol. Chem.*, **244**, 727-735.
- Oliver,A., Canton,R., Campo,P., Baquero,F., and Blazquez,J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, **288**, 1251-1254.
- Oliver,A., Baquero,F., and Blazquez,J. (2002). The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol. Microbiol.*, **43**, 1641-1650.
- Orencia,M.C., Yoon,J.S., Ness,J.E., Stemmer,W.P., and Stevens,R.C. (2001). Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 238-242.
- Parker,B.O. and Marinus,M.G. (1992). Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **89**, 1730-1734.
- Partridge,L. and Morgan,M.J. (1988). Is bacterial evolution random or selective? *Nature*, **336**, 22.
- Pereyre,S., Gonzalez,P., De Barbeyrac,B., Darnige,A., Renaudin,H., Charron,A., Raherison,S., Bebear,C., and Bebear,C.M. (2002). Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3142-3150.
- Pereyre,S. (2003). Mécanismes responsables de la résistance naturelle et acquise aux macrolides et apparentés chez *Mycoplasma hominis* et de la résistance acquise à ces antibiotiques chez *Mycoplasma pneumoniae*. 208p. Th ; Sciences Biologiques et Médicales Option Biologie-Santé ; Bordeaux ; n°2003BOR21066
- Pereyre,S., Guyot,C., Renaudin,H., Charron,A., Bebear,C., and Bebear,C.M. (2004). *In vitro* selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 460-465.
- Peric,M., Bozdogan,B., Jacobs,M.R., and Appelbaum,P.C. (2003). Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1017-1022.



- Pernodet, J.L., Fish, S., Blondelet-Rouault, M.H., and Cundliffe, E. (1996). The macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes characterized by using a specifically deleted, antibiotic-sensitive strain of *Streptomyces lividans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 581-585.
- Pestka, S. (1974). Binding of [<sup>14</sup>C]erythromycin to *Escherichia coli* ribosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 474-478.
- Petit, C. and Sancar, A. (1999). Nucleotide excision repair: from *E. coli* to man. *Biochimie*, **81**, 15-25.
- Petit, M.A., Dimpfl, J., Radman, M., and Echols, H. (1991). Control of large chromosomal duplications in *Escherichia coli* by the mismatch repair system. *Genetics*, **129**, 327-332.
- Picard, B., Duriez, P., Gouriou, S., Matic, I., Denamur, E., and Taddei, F. (2001). Mutator natural *Escherichia coli* isolates have an unusual virulence phenotype. *Infect. Immun.*, **69**, 9-14.
- Pihlajamaki, M., Kataja, J., Seppala, H., Elliot, J., Leinonen, M., Huovinen, P., and Jalava, J. (2002). Ribosomal mutations in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 654-658.
- Porse, B.T. and Garrett, R.A. (1999). Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. *J. Mol. Biol.*, **286**, 375-387.
- Preud'homme, J., Belloc, A.C.Y., and Tarridec, P. (1965). Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action : la pristinamycine. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **260**, 1309-1312.
- Priebe, S.D., Hadi, S.M., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1988). Nucleotide sequence of the *hexA* gene for DNA mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae* and homology of *hexA* to *mutS* of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **170**, 190-196.
- Prudhomme, M., Martin, B., Mejean, V., and Claverys, J.P. (1989). Nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae hexB* mismatch repair gene: homology of HexB to MutL of *Salmonella typhimurium* and to PMS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **171**, 5332-5338.
- Prudhomme, M., Mejean, V., Martin, B., and Claverys, J.P. (1991). Mismatch repair genes of *Streptococcus pneumoniae*: HexA confers a mutator phenotype in *Escherichia coli* by negative complementation. *J. Bacteriol.*, **173**, 7196-7203.
- Prunier, A.L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J.F., and Leclercq, R. (2003). High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J. Infect. Dis.*, **187**, 1709-1716.
- Radman, M. (1989). Mismatch repair and the fidelity of genetic recombination. *Genome*, **31**, 68-73.
- Radman, M., Matic, I., Halliday, J.A., and Taddei, F. (1995). Editing DNA replication and recombination by mismatch repair: from bacterial genetics to mechanisms of predisposition to cancer in humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **347**, 97-103.

- Radman,M. (1999). Enzymes of evolutionary change. *Nature*, **401**, 866-7, 869.
- Radman,M., Taddei,F., and Matic,I. (2000). Evolution-driving genes. *Res. Microbiol.*, **151**, 91-95.
- Rainey,B.P. and Moxon,E.R. (2000). Microbiology. When being hyper keeps you fit. *Science*, **288**, 1186-1187.
- Ramsey,B.W. (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J Med.*, **335**, 179-188.
- Rayssiguier,C., Thaler,D.S., and Radman,M. (1989). The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature*, **342**, 396-401.
- Reenan,R.A. and Kolodner,R.D. (1992). Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics*, **132**, 963-973.
- Reinert,R.R., Wild,A., Appelbaum,P., Lutticken,R., Cil,M.Y., and Al Lahham,A. (2003). Ribosomal mutations conferring resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* clinical strains isolated in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2319-2322.
- Reynolds,E., Ross,J.I., and Cove,J.H. (2003). Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob. Agents*, **22**, 228-236.
- Richardson,A.R. and Stojiljkovic,I. (2001). Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.*, **40**, 645-655.
- Richardson,A.R., Yu,Z., Popovic,T., and Stojiljkovic,I. (2002). Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **99**, 6103-6107.
- Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z., Zielenski,J., Lok,S., Plavsic,N., Chou,J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066-1073.
- Roberts,M.C., Sutcliffe,J., Courvalin,P., Jensen,L.B., Rood,J., and Seppala,H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2823-2830.
- Roman,F., Canton,R., Perez-Vazquez,M., Baquero,F., and Campos,J. (2004). Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1450-1459.
- Rommens,J.M., Iannuzzi,M.C., Kerem,B., Drumm,M.L., Melmer,G., Dean,M., Rozmahel,R., Cole,J.L., Kennedy,D., Hidaka,N., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, **245**, 1059-1065.
- Ross,J.I., Eady,E.A., Cove,J.H., Cunliffe,W.J., Baumberg,S., and Wootton,J.C. (1990). Inducible erythromycin resistance in *staphylococci* is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1207-1214.

- Ross,J.I., Eady,E.A., Cove,J.H., and Baumberg,S. (1995). Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene*, **153**, 93-98.
- Ross,J.I., Eady,E.A., Cove,J.H., and Baumberg,S. (1996). Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene*, **183**, 143-148.
- Ross,J.I., Eady,E.A., Cove,J.H., Jones,C.E., Ratyal,A.H., Miller,Y.W., Vyakrnam,S., and Cunliffe,W.J. (1997). Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous *propionibacteria* isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1162-1165.
- Sander,P., Prammananan,T., Meier,A., Frischkorn,K., and Bottger,E.C. (1997). The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol. Microbiol.*, **26**, 469-480.
- Sander,P., Springer,B., Prammananan,T., Sturmfels,A., Kappler,M., Pletschette,M., and Bottger,E.C. (2002). Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1204-1211.
- Sasaki,M., Yonemura,Y., and Kurusu,Y. (2000). Genetic analysis of *Bacillus subtilis* mutator genes. *J Gen. Appl. Microbiol.*, **46**, 183-187.
- Schaaff,F., Reipert,A., and Bierbaum,G. (2002). An Elevated Mutation Frequency Favors Development of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3540-3548.
- Schaaff,F., Bierbaum,G., Baumert,N., Bartmann,P., and Sahl,H.G. (2003). Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **293**, 427-435.
- Schlunzen,F., Harms,J.M., Franceschi,F., Hansen,H.A., Bartels,H., Zarivach,R., and Yonath,A. (2003). Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure.*, **11**, 329-338.
- Schmitz,F.J., Verhoef,J., and Fluit,A.C. (1999). Prevalence of resistance to MLS antibiotics in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY surveillance programme. Sentry Participants Group. *J Antimicrob. Chemother.*, **43**, 783-792.
- Schmitz,F.J., Petridou,J., Fluit,A.C., Hadding,U., Peters,G., and von Eiff,C. (2000a). Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. M.A.R.S. Study Group. Multicentre Study on Antibiotic Resistance in Staphylococci. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **19**, 385-387.
- Schmitz,F.J., Sadurski,R., Kray,A., Boos,M., Geisel,R., Kohrer,K., Verhoef,J., and Fluit,A.C. (2000b). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob. Chemother.*, **45**, 891-894.
- Schmitz,F.J., Petridou,J., Astfalk,N., Scheuring,S., Kohrer,K., Verhoef,J., Fluit,A.C., and Schwarz,S. (2001). Structural alterations in the translational attenuator of constitutively

expressed *erm(A)* genes in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1603-1604.

Schmitz,F.J., Petridou,J., Jagusch,H., Astfalk,N., Scheuring,S., and Schwarz,S. (2002). Molecular characterization of ketolide-resistant *erm(A)*-carrying *Staphylococcus aureus* isolates selected *in vitro* by telithromycin, ABT-773, quinupristin and clindamycin. *J Antimicrob. Chemother.*, **49**, 611-617.

Schofield,M.J., Brownwell,F.E., Nayak,S., Du,C., Kool,E.T., and Hsieh,P. (2001). The Phe-X-Glu DNA binding motif of MutS. The role of hydrogen bonding in mismatch recognition. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45505-45508.

Schofield,M.J. and Hsieh,P. (2003). DNA mismatch repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 579-608.

Schönfeld,W. and Mutak,S. (2002). Azithromycin and novel azalides. In Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 73-96.

Shen,P. and Huang,H.V. (1986). Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics*, **112**, 441-457.

Siegrist,S., Moreau,N., and Le Goffic,F. (1984). Photochemical affinity labeling of the macrolide binding site on the 70S *E. coli* ribosome. *C. R. Acad. Sci. III*, **299**, 49-51.

Smania,A.M., Segura,I., Pezza,R.J., Becerra,C., Albesa,I., and Argarana,C.E. (2004). Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **150**, 1327-1338.

Smith,B.T., Grossman,A.D., and Walker,G.C. (2001). Visualization of mismatch repair in bacterial cells. *Mol. Cell*, **8**, 1197-1206.

Smith,J.M., Dowson,C.G., and Spratt,B.G. (1991). Localized sex in bacteria. *Nature*, **349**, 29-31.

Sniegowski,P.D., Gerrish,P.J., and Lenski,R.E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature*, **387**, 703-705.

Spiliopoulou,I., Petinaki,E., Papandreou,P., and Dimitracopoulos,G. (2004). *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. *J Antimicrob. Chemother.*, **53**, 814-817.

Spratt,B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*, **264**, 388-393.

Stambuk,S. and Radman,M. (1998). Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. *Genetics*, **150**, 533-542.

Stamm,L.V. and Bergen,H.L. (2000). A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 806-807.

Su,S.S. and Modrich,P. (1986). *Escherichia coli mutS*-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **83**, 5057-5061.

Sutcliffe,J., Tait-Kamradt, A., Walker, A., and Petitpas, J. (2000). Macrolide resistance in *pneumococci* : Analysis of resistant isolates obtained by passage with telithromycin. *In* program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Ontario, Canada, abst. 1925:117.

Sutcliffe,J. and Leclercq,R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides, lincosamides, and ketolides. *In* Kirst,H. and Schönfeld,W. (Eds.), *Macrolides*, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, pp. 281-318.

Taddei,F., Matic,I., Godelle,B., and Radman,M. (1997a). To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol.*, **5**, 427-428.

Taddei,F., Radman,M., Maynard-Smith,J., Toupance,B., Gouyon,P.H., and Godelle,B. (1997b). Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature*, **387**, 700-702.

Tait-Kamradt,A., Davies,T., Cronan,M., Jacobs,M.R., Appelbaum,P.C., and Sutcliffe,J. (2000a). Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected *in vitro* by macrolide passage. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2118-2125.

Tait-Kamradt,A., Davies,T., Appelbaum,P.C., Depardieu,F., Courvalin,P., Petitpas,J., Wondrack,L., Walker,A., Jacobs,M.R., and Sutcliffe,J. (2000b). Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3395-3401.

Tanabe,K., Kondo,T., Onodera,Y., and Furusawa,M. (1999). A conspicuous adaptability to antibiotics in the *Escherichia coli* mutator strain, *dnaQ49*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**, 191-196.

Tateda,K., Comte,R., Pechere,J.C., Kohler,T., Yamaguchi,K., and Van Delden,C. (2001). Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1930-1933.

Taylor,D.E., Ge,Z., Purych,D., Lo,T., and Hiratsuka,K. (1997). Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2621-2628.

Tejedor,F. and Ballesta,J.P. (1985). Components of the macrolide binding site on the ribosome. *J Antimicrob. Chemother.*, **16 Suppl A**, 53-62.

Tenaillon,O., Toupance,B., Le Nagard,H., Taddei,F., and Godelle,B. (1999). Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics*, **152**, 485-493.

Tenaillon,O., Le Nagard,H., Godelle,B., and Taddei,F. (2000). Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **97**, 10465-10470.

- Tenaillon,O., Taddei,F., Radmian,M., and Matic,I. (2001). Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res. Microbiol.*, **152**, 11-16.
- Tenson,T., Lovmar,M., and Ehrenberg,M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol. Biol.*, **330**, 1005-1014.
- Teraoka,H. and Nierhaus,K.H. (1978). Proteins from *Escherichia coli* ribosomes involved in the binding of erythromycin. *J Mol. Biol.*, **126**, 185-193.
- Thompson,J., Kim,D.F., O'Connor,M., Lieberman,K.R., Bayfield,M.A., Gregory,S.T., Green,R., Noller,H.F., and Dahlberg,A.E. (2001). Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 9002-9007.
- Tiraby,J.G. and Fox,M.S. (1973). Marker discrimination in transformation and mutation of *pneumococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **70**, 3541-3545.
- Treffers,H.P., Spinelli,V., and Belser,N.O. (1954). A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **40**, 1064-1071.
- Umar,A., Buermeyer,A.B., Simon,J.A., Thomas,D.C., Clark,A.B., Liskay,R.M., and Kunkel,T.A. (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*, **87**, 65-73.
- Unge,J., berg,A., Al Kharadaghi,S., Nikulin,A., Nikonov,S., Davydova,N., Nevskaya,N., Garber,M., and Liljas,A. (1998). The crystal structure of ribosomal protein L22 from *Thermus thermophilus*: insights into the mechanism of erythromycin resistance. *Structure.*, **6**, 1577-1586.
- Vannuffel,P. and Cocito,C. (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, **51** (Suppl 1), 20-30.
- Versalovic,J., Shortridge,D., Kibler,K., Griffy,M.V., Beyer,J., Flamm,R.K., Tanaka,S.K., Graham,D.Y., and Go,M.F. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 477-480.
- Vester,B. and Douthwaite,S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1-12.
- Vulic,M., Dionisio,F., Taddei,F., and Radman,M. (1997). Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**, 9763-9767.
- Vulic,M., Lenski,R.E., and Radman,M. (1999). Mutation, recombination, and incipient speciation of bacteria in the laboratory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**, 7348-7351.
- Wallace,R.J., Jr., Meier,A., Brown,B.A., Zhang,Y., Sander,P., Onyi,G.O., and Bottger,E.C. (1996). Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1676-1681.

- Walsh,F., Willcock,J., and Amyes,S. (2003). High-level telithromycin resistance in laboratory-generated mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob. Chemother.*, **52**, 345-353.
- Wang,G. and Taylor,D.E. (1998). Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 1952-1958.
- Watson,M.E., Jr., Burns,J.L., and Smith,A.L. (2004). Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology*, **150**, 2947-2958.
- Weisblum,B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 577-585.
- Willems,R.J., Top,J., Smith,D.J., Roper,D.I., North,S.E., and Woodford,N. (2003). Mutations in the DNA mismatch repair proteins MutS and MutL of oxazolidinone-resistant or -susceptible *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 3061-3066.
- Wimberly,B.T., Brodersen,D.E., Clemons,W.M., Jr., Morgan-Warren,R.J., Carter,A.P., Vornrhein,C., Hartsch,T., and Ramakrishnan,V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327-339.
- Wittmann,H.G., Stoffler,G., Apirion,D., Rosen,L., Tanaka,K., Tamaki,M., Takata,R., Dekio,S., and Otaka,E. (1973). Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **127**, 175-189.
- Wolter,J., Seeney,S., Bell,S., Bowler,S., Masel,P., and McCormack,J. (2002). Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax*, **57**, 212-216.
- Wondrack,L., Massa,M., Yang,B.V., and Sutcliffe,J. (1996). Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 992-998.
- Worbs,M., Huber,R., and Wahl,M.C. (2000). Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon. *EMBO J.*, **19**, 807-818.
- Worth,L., Jr., Clark,S., Radman,M., and Modrich,P. (1994). Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 3238-3241.
- Wozniak,D.J. and Keyser,R. (2004). Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, **125**, 62S-69S.
- Xiong,L., Shah,S., Mauvais,P., and Mankin,A.S. (1999). A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre. *Mol. Microbiol.*, **31**, 633-639.
- Yang,W. (2000). Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat. Res.*, **460**, 245-256.

Youngman,E.M., Brunelle,J.L., Kochaniak,A.B., and Green,R. (2004). The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell*, **117**, 589-599.

Yusupov,M.M., Yusupova,G.Z., Baucom,A., Lieberman,K., Earnest,T.N., Cate,J.H., and Noller,H.F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**, 883-896.

Zahrt,T.C. and Maloy,S. (1997). Barriers to recombination between closely related bacteria: MutS and RecBCD inhibit recombination between *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, **94**, 9786-9791.

Zahrt,T.C., Buchmeier,N., and Maloy,S. (1999). Effect of *mutS* and *recD* mutations on *Salmonella* virulence. *Infect. Immun.*, **67**, 6168-6172.

Zawadzki,P., Roberts,M.S., and Cohan,F.M. (1995). The log-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics*, **140**, 917-932.

Zhanel,G.G., Walters,M., Noreddin,A., Vercaigne,L.M., Wierzbowski,A., Embil,J.M., Gin,A.S., Douthwaite,S., and Hoban,D.J. (2002). The ketolides: a critical review. *Drugs*, **62**, 1771-1804.

Zurawski,G. and Zurawski,S.M. (1985). Structure of the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4521-4526.



## **ANNEXES**

## **PUBLICATION SUPPLEMENTAIRE**

**Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Hypermutable and Resistant to Fluoroquinolones**

Hiep N'Guyen Trong, Anne-Laure Prunier et Roland Leclercq.

Soumis pour publication.

## LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- 2004 Prunier AL, Leclercq R. Analysis of *mutS* and *mutL* mutator genes in *Staphylococcus aureus*. Soumis pour publication.
- 2004 N'Guyen Trong H, Prunier AL, Leclercq R. Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Hypermutable and Resistant to Fluoroquinolones. Soumis pour publication.
- 2004 Prunier AL, N'Guyen Trong H, Tandé D, Segond C, Leclercq R. Mutation of L4 ribosomal protein conferring unusual macrolide resistance in two independent clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug resist. Accepté pour publication.
- 2003 Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from Cystic fibrosis patients reveals high proportions of hypermutable strains. J Infect Dis. 2003;187(11):1709-16.
- 2002 Prunier AL, Malbruny B, Tande D, Picard B, Leclercq R. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:3054-6.

### Communications dans des congrès internationaux (présentateur)

- 2004 N'Guyen TH, Prunier AL, Leclercq R.  
Hypermutable and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus*.  
44<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy (ICAAC) - Washington (USA) - Résumé n°C1-1103.
- 2003 Prunier AL, Leclercq R.  
High proportion of hypermutable *Staphylococcus aureus* strains isolated from cystic fibrosis (CF) patients.  
17<sup>th</sup> North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) - Anaheim (USA) - Poster n°. 308.  
**Bourse de voyage.**
- 2002 Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R.  
High incidence of erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cystic fibrosis patients reveals the presence of hypermutable strains.  
25<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference (ECFC) - Gènes (Italie) - Résumé n°OP1.10/P186.
- 2001 Prunier AL, Malbruny B, Clarebout G, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R.  
High rates of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from Cystic Fibrosis patients reveals high proportions of hypermutable strains. 41<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy (ICAAC) - Chicago (USA) - Late Breaker Abstract LB 7.

## Communications dans des congrès français

- 2003** Prunier AL, Leclercq R.  
Rôle de *mutS* et *mutL* dans l'hypermutabilité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose.  
10<sup>ème</sup> Séminaire de recherche junior SPILF/SFM - 23<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) - Paris.  
**Prix SFM (Société Française de Microbiologie) de la meilleure présentation.**
- 2003** Prunier AL, Leclercq R.  
Rôle de *mutS* et *mutL* dans l'hypermutabilité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose. 2<sup>ème</sup> colloque microorganismes et environnement - Rennes - Poster N° 27.
- 2003** Prunier AL, Leclercq R.  
Rôle de *mutS* et *mutL* dans l'hypermutabilité des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose. 4<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs de la Mucoviscidose - Paris.  
**Prix VLM (Vaincre la Mucoviscidose) de la meilleure présentation.**
- 2002** Prunier AL, Leclercq R.  
Souches cliniques de *Staphylococcus aureus* hypermutables : rôle de *mutS*.  
9<sup>ème</sup> Séminaire de recherche junior SPILF/SFM - 22<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) - Paris.
- 2002** Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R.  
La haute fréquence de résistance aux macrolides chez les staphylocoques isolés chez les patients mucoviscidosiques révèle la présence de souches hypermutables. 1<sup>er</sup> journée scientifique du PRBME (Pôle de Recherche en Biologie Médicale et Epidémiologie) - Caen.
- 2001** Prunier AL, Malbruny B, Clarebout G, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. La mutation de la cible ribosomale est le mécanisme essentiel de résistance aux macrolides chez les souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mucoviscidose.  
21<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) - Paris - Abstract n°80/C14.
- 2001** Prunier AL, Malbruny B, Clarebout G, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R. Résistance et virulence des bactéries à Gram positif : résistance aux macrolides et gènes mutateurs chez *Staphylococcus aureus*. Société Française de Microbiologie, Institut Pasteur 2001, 5 décembre - Paris.

# INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

<b>Tableau 1.</b> Mutations de l'ARNr 23S associées à des résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes.....	68
<b>Tableau 2.</b> Mutations de la protéine ribosomale L4 (gène <i>rplD</i> ) responsables de résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes.....	72
<b>Tableau 3.</b> Mutations de la protéine ribosomale L22 (gène <i>rplV</i> ) responsables de résistances aux MLS chez les bactéries pathogènes.....	73
<b>Tableau 4.</b> Résultats du séquençage des gènes <i>sodA</i> et <i>spa</i> chez 4 souches de <i>S. aureus</i> présentant de nombreuses mutations ribosomales.....	85
<b>Tableau 5.</b> Résultats du séquençage de chaque copie du gène <i>rrl</i> chez les souches présentant deux mutations ribosomales proches.....	92
<b>Figure 1.</b> Les différentes voies permettant aux bactéries d'acquérir des mutations adaptatives.....	17
<b>Figure 2.</b> Le Système de Réparation des Mésappariements (SRM) chez <i>E. coli</i> .....	18
<b>Figure 3.</b> Structure de la protéine MutS liée à un ADN hétéroduplexe.....	20
<b>Figure 4.</b> Structure de LN40 liée à l'ADPnP (analogue non hydrolysable de l'ATP).....	22
<b>Figure 5.</b> Organisation de l'opéron <i>mutSL</i> .....	26
<b>Figure 6.</b> Schéma présentant la réponse mutationnelle d'une population bactérienne à des pressions d'antibiotiques successives.....	35
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique des mécanismes moléculaires impliqués dans la recombinaison entre séquences d'ADN homologues ou homéologues.....	38
<b>Figure 8.</b> Structure chimique de l'érythromycine A et exemples de modifications des substituants pour la synthèse de dérivés.....	46
<b>Figure 9.</b> Classification des macrolides.....	46
<b>Figure 10.</b> Structure chimique de l'azithromycine.....	47
<b>Figure 11.</b> Structure chimique des macrolides à 16 atomes.....	48
<b>Figure 12.</b> Structure chimique de la télithromycine, avec les modifications apportées à la structure chimique de l'érythromycine.....	49
<b>Figure 13.</b> Structure chimique de la lincomycine et de la clindamycine.....	50

<b>Figure 14.</b> Structure chimique des streptogramines B (pristinamycine IA et quinupristine) et des streptogramines A (pristinamycine IIA et dalfopristine).....	51
<b>Figure 15.</b> Structure secondaire de l'ARNr 23S.....	54
<b>Figure 16.</b> Structure du ribosome 70S de <i>T. thermophilus</i> déterminée par cristallographie aux rayons X.....	55
<b>Figure 17.</b> Les étapes de la traduction : Initiation, Elongation, Terminaison.....	56
<b>Figure 18.</b> Structures ribosomales impliquées dans la synthèse peptidique.....	58
<b>Figure 19.</b> Nucléotides de l'ARNr 23S impliqués dans l'interaction MLS-ribosome identifiés par les expériences de <i>footprinting</i> .....	60
<b>Figure 20.</b> Vue générale du site de fixation des macrolides montrant comment ils bloquent le tunnel de sortie des polypeptides chez <i>H. marismortui</i> .....	62
<b>Figure 21.</b> Structure de la protéine ribosomale L4 de <i>H. marismortui</i> .....	75
<b>Figure 22.</b> Structure de la protéine ribosomale L22.....	75
<b>Figure 23.</b> Modélisation de la structure tertiaire de la protéine L22 par le logiciel SWISS-MODEL (Guex et Peitsch, 1997). A. Structure de la protéine sauvage. B. Structure de la protéine mutée de la souche UCN 15.....	80
<b>Figure 24.</b> Alignements multiples de portions des protéines MutS et MutL de <i>S. aureus</i> .....	89
<b>Figure 25.</b> Fréquences de mutation comparées de souches mutatrices (UCN23, UCN30 et UCN22) et non mutatrices (GR87 et RN4220) sur érythromycine, azithromycine et télithromycine.....	97

*Ce que tu cherches cela est proche et déjà vient de toi.*

Friedrich Hölderlin

---

## Résumé en français

L'observation que nous avons faite d'une plus grande fréquence de souches de *Staphylococcus aureus* hypermutables isolées chez les patients atteints de mucoviscidose que chez un panel de souches témoins nous a amené à étudier les mécanismes de l'hypermutabilité chez cette espèce. L'analyse des gènes du système de réparation des mésappariements, *mutS* et *mutL*, a montré pour quatre souches cliniques une relation de cause à effet entre l'altération de ces gènes et leur phénotype hypermutable. Nous avons montré que ces gènes étaient co-transcrits chez *S. aureus* et que l'inactivation de l'un ou l'autre conduisait à un phénotype hypermutable. Nous avons mis au point un modèle pour l'étude de l'effet de ces gènes sur la recombinaison chez *S. aureus*, qui semble montrer que tous deux n'ont qu'un rôle limité dans le phénomène chez cette espèce.

Cette propriété d'hypermutabilité a aussi un impact sur la résistance aux antibiotiques des souches. En effet, la résistance aux antibiotiques du groupe des macrolides est de plus en plus fréquente chez les souches de *S. aureus* isolées lors de la mucoviscidose, et nous avons montré qu'elle n'était pas due à des gènes de résistance portés par des plasmides ou des transposons mais, de façon très inhabituelle, à des mutations de la cible ribosomale des macrolides. Nous avons ainsi mis en évidence des mutations dans les gènes *rpl* (codant l'ARN ribosomal), *rplD* et *rplV* (codant respectivement les protéines ribosomales L4 et L22).

---

## Titre en anglais

Hypermutability and adaptation in *Staphylococcus aureus* isolated from cystic fibrosis: role of *mutS* and *mutL* genes and impact on macrolide resistance

---

## Résumé en anglais

Our observation that *S. aureus* strains isolated from cystic fibrosis were more frequently hypermutable than those isolated in other pathologies led us to explore the mechanisms underlying hypermutability in this species. Alterations of the mismatch repair system genes, *mutS* and *mutL*, accounted for the hypermutable phenotype of four clinical strains. We showed that both genes were cotranscribed in *S. aureus* and that inactivation of either gene resulted in an hypermutable phenotype. We designed a model to study the role of these genes in recombination in *S. aureus*, which seemed to show that both only have a limited role in the phenomenon in this species.

Hypermutability has also an impact on antibiotic resistance of the strains: macrolide resistance is more and more frequent in *S. aureus* strains isolated from cystic fibrosis, and we showed that, unexpectedly, it could not be attributed to transposon or plasmid-borne resistance genes, but that it was mostly due to mutations in the ribosomal target of these antibiotics. We thus described mutations in the following genes: *rpl* (encoding ribosomal RNA), *rplD* and *rplV* (encoding ribosomal proteins L4 and L22, respectively).

---

## Mots-Clés

Hypermutabilité, adaptation, *mutS*, *mutL*, mucoviscidose, résistance, antibiotiques, mutation, ribosome, macrolides, *Staphylococcus aureus*

---

## Discipline

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

---

## Intitulé et adresse du laboratoire

Relations hôte et microorganismes des épithéliums, EA 2128, Faculté de médecine, Université de Caen Basse-Normandie.