

Résistance aux antibiotiques : modèle privilégié d'étude de la circulation génétique

Les bactéries du sol productrices d'antibiotiques possèdent également des gènes de résistance les protégeant contre ces substances. Ces bactéries pourraient être à l'origine de la diffusion de la résistance aux antibiotiques parmi les espèces pathogènes.

Patrick Trieu-Cuot

Chargé de recherche, unité des agents antibactériens, Cnrs U.A. 271, Institut Pasteur.

Patrice Courvalin

Chef de l'unité des agents antibactériens, Cnrs U.A. 271, Institut Pasteur.

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène contrôlé génétiquement. Son déterminisme résulte soit d'une mutation chromosomique, soit de l'acquisition d'un (ou de plusieurs) gène(s) qui rend(ent) la bactérie insensible à l'antibiotique. La résistance bactérienne par mutation chromosomique est la conséquence d'un changement des structures cellulaires existantes, qui rend la cellule imperméable à un ou plusieurs antibiotiques, ou encore rend les cibles intracellulaires spécifiques de ces antibiotiques indifférentes à la présence du ou des antibiotiques. Ce type de résistance ne concerne qu'un faible pourcentage des souches pathogènes résistantes isolées en clinique humaine. D'autre part, elle est limitée à certains antibiotiques et surtout elle n'est pas transmissible. La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique est généralement due à la synthèse de protéines. Ces protéines confèrent la résistance à l'hôte, soit en altérant la cible de l'antibiotique, soit en

diminuant le transport de l'antibiotique, soit en inactivant l'antibiotique, soit encore en substituant une cible insensible à la présence d'antibiotique à celle, sensible, normalement présente dans la bactérie. Ce type de résistance, qui concerne la quasi-totalité des antibiotiques, représente la majorité des cas isolés en clinique. Les gènes codant pour ces protéines sont fréquemment situés sur des plasmides autotransférables* ou sur des éléments transposables. Ils constituent donc des traceurs épidémiologiques de choix pour l'étude de la circulation de l'information génétique dans les conditions naturelles.

Les aminosides

Les aminosides sont, à l'exception de la kasugamycine et de la spectinomycine, des inhibiteurs bactéricides de la synthèse protéique. La streptomycine, qui est l'aminoside dont le mode d'action a été le plus étudié, a une action pléiotrope *in vitro* sur les bactéries sen-

ADRESSE

P. Trieu-Cuot, P. Courvalin : unité des agents antibactériens, Cnrs U.A. 271, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15.

* Voir glossaire, p. 88.

sibles : perturbation de la synthèse protéique, stimulation de la synthèse d'ARN, altération de la membrane cytoplasmique, inhibition de la respiration (pour une information détaillée, voir [1]). L'activité bactéricide de cet antibiotique est, sans aucun doute, due à son association irréversible avec le ribosome bactérien. Cette association provoque une diminution de la fidélité de lecture des ARN messagers (ARNm). Les causes exactes des autres modifications physiologiques observées *in vivo* ne sont pas actuellement connues. Les aminosides appartenant aux groupes des néomycines et des kanamycines-gentamicines exercent de multiples effets sur la synthèse protéique. Ils induisent non seulement des erreurs de traduction de l'ARNm en protéine, mais inhibent également l'initiation ainsi que l'élongation des chaînes polypeptidiques. Les aminosides sont, avec les bêta-lactamines, les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections sévères à germes tant Gram positif que Gram négatif. Cependant, leur utilisation massive, notamment en milieu hospitalier, a entraîné la sélection de bactéries résistantes. Dans la majorité des cas, la résistance aux aminosides est due à l'acquisition par les bactéries d'un mécanisme permettant la modification (détoxication, inactivation) de l'antibiotique ; ce dernier ne peut alors plus interagir avec sa cible, le ribosome. Les enzymes modificateuses des aminosides peuvent être divisées en trois classes selon la réaction qu'elles catalysent : *O*-phosphorylation, *O*-nucléotidylation ou *N*-acétylation. Les enzymes présentes dans ces diverses classes sont dénommées aminoside-*O*-phosphotransférase (APH), aminoside-*O*-nucléotidyltransférase (ANT) et aminoside-*N*-acétyltransférase (AAC), respectivement. Les réactions de phosphorylation et de nucléotidylation ont pour cofacteur l'ATP, celle d'acétylation l'acétyl CoA (figure 1). Ces différentes classes sont subdivisées en sous-classes selon le site modifié sur la molécule

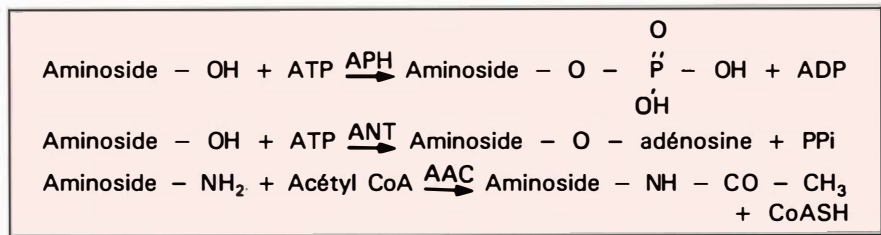


Figure 1. Mécanismes biochimiques de modification des aminosides par les phosphotransférases (APH), nucléotidyltransférases (ANT) et acétyltransférases (AAC).

d'antibiotique (Tableau I). Les enzymes modificateuses sont largement répandues dans les espèces pathogènes. Elles ont été trouvées chez les cocci à Gram positif et chez les bacilles à Gram négatif et leur distribution entre ces deux « groupes » est empreinte d'une relative spécificité. Les activités *N*-acétyltransférase et *O*-phosphotransférase présentent la

particularité d'avoir été détectées également chez certains microorganismes producteurs d'antibiotiques (Tableau I). Cette observation a conduit certains auteurs à suggérer que les microorganismes producteurs pourraient être la source des gènes de résistance aux antibiotiques [2, 3]. Pour ces raisons, nous avons choisi les 3'-aminoside phosphotransférases

Tableau I

CLASSES D'ENZYMES MODIFICATEUSES DES AMINOSIDES DÉTECTÉES CHEZ LES BACTÉRIES A GRAM POSITIF ET A GRAM NÉGATIF

Enzyme	Gram négatif	Gram positif		
		streptocoque	staphylocoque	producteur d'antibiotique
Phosphotransférase				
APH(6)	+	?	-	+
APH(3')	+	+	+	+
APH(2'')	-	+	+	-
APH(3''')	+	?	+	+
APH(5'')	+	-	-	-
Nucléotidyltransférase				
ANT(6)	-	?	+	-
ANT(9)	-	-	+	-
ANT(4')	-	+	+	-
ANT(2'')	+	?	?	-
ANT(3''')(9)	+	?	+	-
Acétyltransférase				
AAC(3)	+	-	?	+
AAC(2')	+	-	-	+
AAC(6')	+	+	+	+

+ : présence d'enzyme ; - : absence d'enzyme ; ? : suspicion de présence d'enzyme ; APH : aminoside phosphotransférase ; ANT : aminoside nucléotidyltransférase ; AAC : aminoside acétyltransférase.

RÉFÉRENCES

- Gale EF, Cundliffe E, Reynolds PE, Richmond MH, Waring MJ. *The molecular basis of antibiotic action*. London, New York, Sidney, Toronto : John Wiley and Sons, 1981 : 418.
- Walker MS, Walker JB. Streptomycin biosynthesis and metabolism. *J Biol Chem* 1970 ; 245 : 6683-9.
- Benveniste R, Davies J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in Actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 ; 72 : 3628-32.
- Davies J, Smith D. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu Rev Microbiol* 1978 ; 32 : 469-518.
- White TJ, Smith DI, Rosenthal S, Davies J. Immunological comparison of aminoglycoside phosphotransferases. In : *Program and Abstract of the 18th Interscientific Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Atlanta, GA, 1978 : Abstr. 287.
- Courvalin P, Fiandt M, Davies J. DNA relationships between genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes from antibiotic-producing bacteria and R-plasmids. In : Schlessinger D, ed. *Microbiology-1978*. Washington : American Society for Microbiology, 1978 : 262-6.
- Oka A, Sugisaki H, Takanamy M. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* 1981 ; 147 : 217-26.
- Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 1982 ; 19 : 327-36.
- Gray G, Fitch W. Evolution of antibiotic resistance genes : The DNA sequence of a kanamycin resistance gene from *Staphylococcus aureus*. *Mol Biol Evol* 1983 ; 1 : 57-66.
- Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5'-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* 1983 ; 23 : 331-41.
- Herbert CJ, Giles IG, Akhtar M. The sequence of an antibiotic resistance gene from an antibiotic-producing bacterium. *FEBS Lett* 1983 ; 160 : 67-71.
- Thompson CJ, Gray G. The nucleotide sequence of Streptomycete aminoglycoside phosphotransferase gene : its relationship to phosphotransferases encoded by resistance plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80 : 5190-4.

comme modèle d'étude de l'évolution et de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques dans les conditions naturelles.

Relations phylogéniques entre les APH (3')

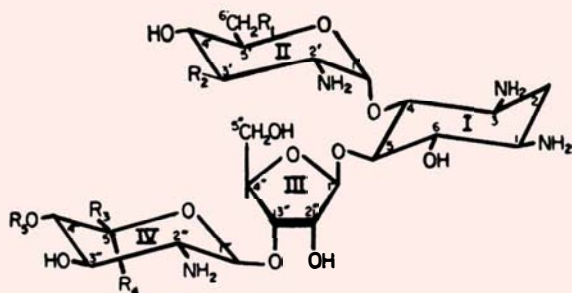
Les 3'-aminoside phosphotransférases [APH(3')] catalysent la phosphorylation du groupement hydroxyle en position 3' de l'aminohexose I de la kanamycine et des aminosides de structure proche (néomycines, paromomycine, ribostamycine, etc.). Cette activité enzymatique, l'une des plus communément rencontrées dans la nature, a été initialement détectée dans une souche d'*E.coli* K12. A ce jour, cinq types d'APH(3') ont été différenciés sur la base de leurs profils de substrats in vitro (Tableau II). Les APH(3') de type I et V ne phosphorylent pas la butirosine bien que la ribostamycine, dont la structure est proche (figure 2), soit un bon substrat. Les APH(3') de type I et III phosphorylent la lividomycine qui ne possède pas de groupement hydroxyle en 3'. La modification de l'antibiotique est alors due à la phosphorylation du groupement hydroxyle en 5' situé d'un point de vue stérique à proximité de la fonction manquante en position 3'. L'APH(3') de type III phosphoryle la butirosine, la lividomycine et l'amikacine mais, in vivo,

les bactéries restent sensibles à ce dernier produit en raison de la faible affinité de l'enzyme pour ce substrat. Les APH(3') de type IV et V ont une gamme étroite de substrats. Les APH(3') de type I et II sont caractéristiques des bactéries à Gram négatif, le type I étant beaucoup plus répandu que le type II. Les APH(3') de type III sont spécifiques des cocci à Gram positif (staphylocoques et streptocoques), les types IV et V ayant été détectés chez *Bacillus circulans* [3] et *Streptomyces fradiae* [4], qui sont les microorganismes utilisés pour la production industrielle de butirosine et de néomycine, respectivement. L'utilisation de techniques immunologiques et d'hybridation des acides nucléiques n'a pas permis de mettre en évidence de relation structurale entre ces différentes protéines [5], ni entre les gènes correspondants [6]. Récemment, les séquences des gènes de structure des cinq types d'APH(3') ont été déterminées, ce qui permet une analyse directe au niveau nucléotidique et peptidique. Ces séquences sont celles des APH(3') portées par les transposons Tn903 (type I) de *Salmonella paratyphi* B et Tn5 (type II) de *Klebsiella pneumoniae*, par les plasmides pSH2 de *Staphylococcus aureus* (type III) et pJHI de *Streptococcus faecalis* (type III), ainsi que par le chromosome de *B. circulans* (type IV) et de *S. fradiae* (type V) [7-12]. La compa-

Tableau II
PROFILS DE SUBSTRATS DES 3'-AMINOSIDE PHOSPHOTRANSFÉRASES

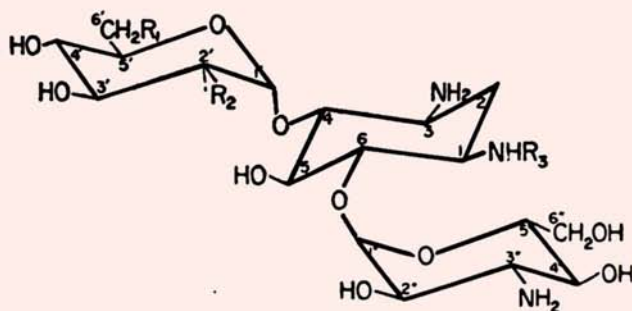
Antibiotique	APH(3')				
	I	II	III	IV	V
Néomycine	+	+	+	+	+
Butirosine	-	+	+	+	-
Lividomycine	+	-	+	-	-
Amikacine	-	-	(+)	-	-
Gentamicine ^(a)	+	+	+	-	-

+ : substrat ; - : non substrat ; (+) : substrat in vitro mais les cellules demeurent sensibles in vivo. (a) gentamicines A et B uniquement.



	R1	R2	R3	R4	R5
Néomycine B	NH ₂	OH	H	CH ₂ NH ₂	H
Néomycine C	NH ₂	OH	CH ₂ NH ₂	H	H
Paromomycine	OH	OH	H CH ₂ NH ₂	CH ₂ NH ₂ H	H
Lividomycine A	OH	H	H	CH ₂ NH ₂	Mannose
Lividomycine B	OH	H	H	CH ₂ NH ₂	H

La néomycine A ne possède pas les cycles III et IV et la ribostamycine le cycle IV de la néomycine B; la butirosine est la 1-N-hydroxy-aminobutiril ribostamycine.



	R1	R2	R3
Kanamycine A	NH ₂	OH	H
Kanamycine B	NH ₂	NH ₂	H
Kanamycine C	OH	NH ₂	H
Amikacine	NH ₂	OH	—CO—CH(OH)CH ₂ —CH ₂ NH ₂

La tobramycine est la 3'-desoxykanamycine B, la dibékacine, la 3'-4'-didesoxykanamycine B et l'habékacine, la 1-N-[4 amino-2 hydroxy-butiril] dibékacine

raison de ces séquences nucléotidiques a révélé que seules les régions situées immédiatement en amont des codons d'arrêt de traduction de ces gènes étaient significativement homologues : les deux premières bases des cinq derniers codons sont identiques dans toutes ces séquences (figure 3). Cette identité permet d'envisager l'utilisation d'un mélange d'hexadécanucléotides synthétisés chimiquement comme sonde « universelle » pour la détection de la résistance à la kanamycine chez les bactéries tant à Gram positif qu'à Gram négatif. La comparaison des séquences peptidiques de ces isoenzymes a montré que 20 % des acides aminés situés aux mêmes positions dans les cinq protéines sont identiques ou homologues (figure 4). Si ces cinq protéines ne sont plus considérées ensemble, mais par paires, le pourcentage d'homologie varie de 36 à 42 % (Tableau III). Les zones d'homologie sont réparties sur l'ensemble des chaînes peptidiques. Toutefois, il apparaît nettement que la partie correspondant au tiers COOH-terminal de ces enzymes est la plus conservée, le pourcentage d'homologie sur l'ensemble des cinq séquences peptidiques étant de 35 %. Ces données structurales, associées aux faits que ces cinq protéines possèdent des tailles similaires et qu'elles catalysent le même type de réaction, indiquent que leurs gènes ont divergé à partir d'un ancêtre commun.

Nous avons analysé ces séquences peptidiques afin de reconstituer leur histoire phylogénique. En effet, si l'on admet que des protéines homologues ont évolué à la même vitesse quelles que soient les contraintes exercées par l'environnement (hypothèse de l'horloge moléculaire*), la comparaison de leurs structures primaires permet de déterminer l'ordre relatif des événements de divergence responsables de l'hétérogénéité observée. Trois arbres phylogéniques ont été construits indépendamment à partir : a) de l'intégralité des cinq séquences peptidiques des APH(3'), b) de leur moitié

Figure 2. Structure des aminosides appartenant aux groupes des néomycines et des kanamycines.

APH(3')-I	CTC	GAT	GAG	TTT	TTC	*** TAA
APH(3')-II	CTT	GAC	GAG	TTC	TTC	*** TGA
APH(3')-III	CTG	GAT	GAA	TTG	TTT	*** TAG
APH(3')-IV	CTG	GAT	GAA	TTT	TTT	*** TGA
APH(3')-V	CTC	GAC	GAG	TTC	TTC	*** TAG

Figure 3. Séquence nucléotidique des extrémités 3'hydroxyle des divers types d'APH(3').

NH₂-terminale, c) de leur moitié COOH-terminale. Dans les trois cas, la topologie des arbres obtenus était différente (figure 5), situation qui ne permet évidemment pas de proposer une hiérarchie de divergence non ambiguë. Ainsi que cela a été montré pour d'autres protéines bactériennes [13], il est vraisemblable que ce résultat reflète une divergence trop importante des gènes des APH(3'). Par ailleurs, la présence de trois de ces cinq gènes, soit sur des éléments transposables (types I et II), soit sur des plasmides (type III) peut avoir contribué, en raison de changements d'hôtes fréquents et d'adaptation à ces derniers, à modifier leur vitesse d'évolution. Dans cette hypothèse,

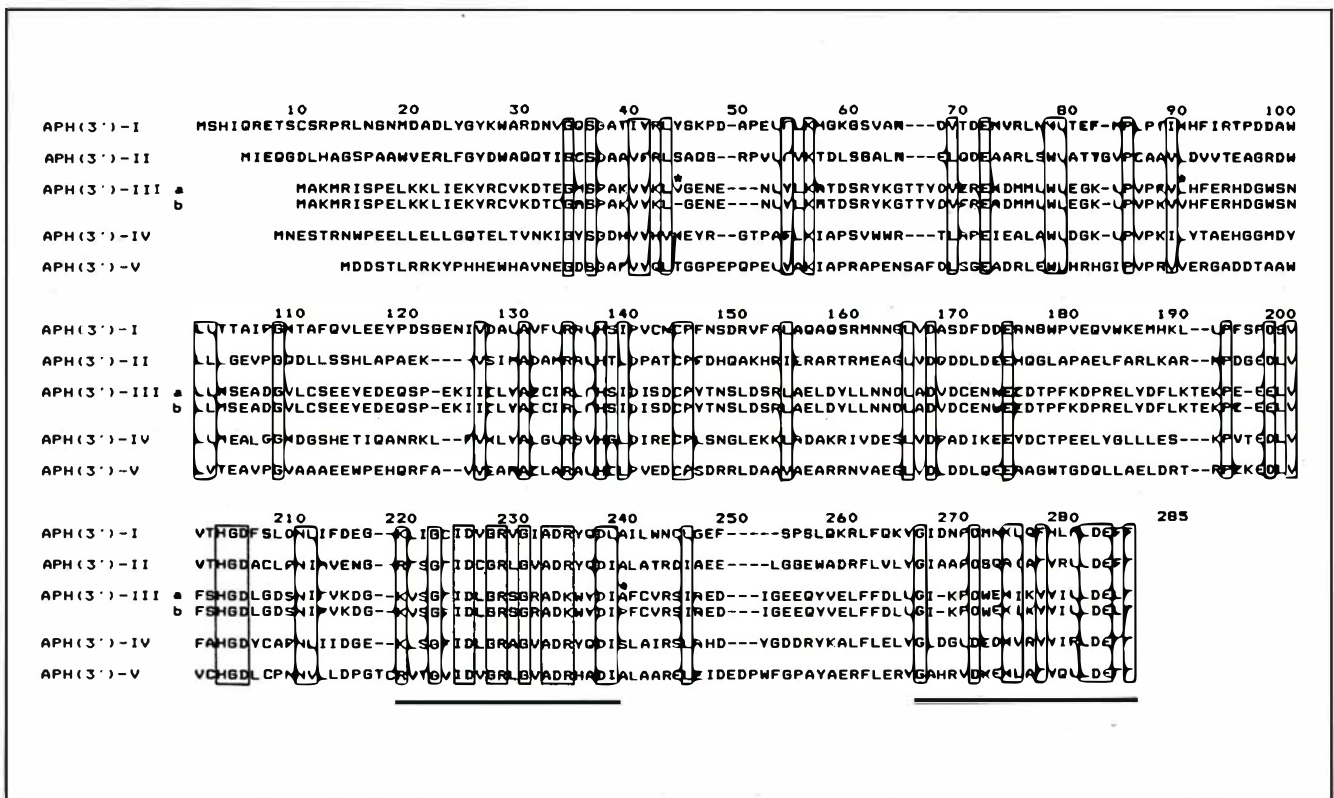


Figure 4. Comparaison des structures primaires des APH(3') de type I, II, III de streptocoque (a) et de staphylocoque (b), IV et V. Le code utilisé selon les recommandations de l'IUPAC/IUB est le suivant : A : Ala, C : Cys, D : Asp, E : Glu, F : Phe, G : Gly, H : His, I : Ile, K : Lys, L : Leu, M : Met, N : Asn, P : Pro, Q : Gln, R : Arg, S : Ser, T : Thr, V : Val, W : Trp, Y : Tyr, - : délétion. Les zones d'identité ou d'homologie (I = L = V, D = E, Q = N, K = R, F = Y, S = T) présentes dans les cinq séquences peptidiques sont encadrées.

qui est contraire à celle de l'horloge moléculaire, il n'est également pas possible d'estimer les temps relatifs de divergence.

Origine des 3'-aminoside phosphotransférases

La capacité des APH(3') de *B. circulans* et de *S. fradiae* à conférer la résistance à la kanamycine a été démontrée par clonage moléculaire chez des hôtes homologues ou hétérologues initialement sensibles [12, 14, 15]. Le phénotype de résistance alors obtenu était impossible à distinguer de celui d'une bactérie pathogène isolée en clinique. Cependant, ni ces résultats, ni les relations structurales existant entre les APH(3'), ne démontrent que les microorganismes producteurs d'antibiotiques aient été la source de certains gènes de résistance aux antibiotiques. Afin de répondre à cette question, il est nécessaire de rechercher l'origine fonctionnelle de ces enzymes. Pour résoudre leur problème d'autotoxicité, les microorganismes producteurs d'antibiotiques utilisent des mécanismes de résistance similaires à ceux rencontrés chez les bactéries pathogènes pour l'homme : inactivation de l'antibiotique, altération de la cible, modification du transport de l'antibiotique (excrétion/exclusion) [16, 17]. *S. fradiae* et *B. circulans* sont résistants aux antibiotiques qu'ils synthétisent, respectivement la néomycine et la butirosine. Les ribosomes de ces microorganismes sont sensibles et, dans les deux cas, la résistance à l'antibiotique synthétisé est probablement due à la présence d'une APH(3') [18, 19]. Il est en effet vraisemblable qu'in vivo, ainsi qu'elles le font in vitro, ces enzymes inactivent l'antibiotique en le phosphorylant. La phosphorylation pourrait constituer la pénultième étape de biosynthèse de l'antibiotique qui serait présent dans le cytoplasme sous forme d'un pré-curseur inactif et serait déphosphorylé au moment de son excrétion [20]. Cette relation résistance/biosynthèse s'accorde bien avec le fait que, chez de nom-

		APH(3')			
		II	III	IV	V
APH(3')	I	41	36	36	42
	II		33	41	41
	III			41	39
	IV				41

Isoleucine = *leucine* = *valine* ; *sérine* = *thréonine* ; *acide glutamique* = *acide aspartique* ; *glutamine* = *asparagine* ; *arginine* = *lysine*.

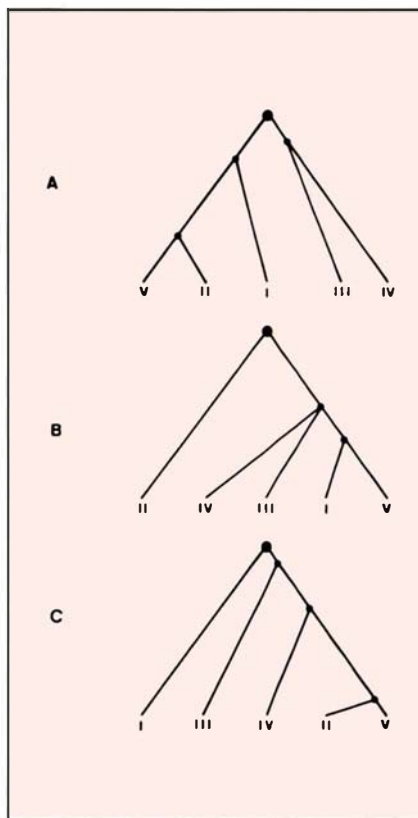


Figure 5. **Dendrogramme des relations phylogéniques entre les divers types d'APH(3')**. Les arbres ont été construits à partir des séquences peptidiques complètes (A), de leurs moitiés NH₂ (B) et COOH terminales (C). La longueur des branches n'est pas proportionnelle au nombre réel de substitution d'acides aminés.

breux microorganismes producteurs d'antibiotiques dont *S. fradiae*, le niveau de résistance à l'antibiotique est un facteur limitant de la production [21]. Par ailleurs, cette relation implique que les gènes de résistance soient initialement apparus chez les microorganismes producteurs d'antibiotique où ils sont nécessaires non seulement pour la résistance mais également pour la biosynthèse. C'est seulement secondairement qu'ils ont été disséminés à d'autres bactéries. Les antibiotiques sont synthétisés par des microorganismes dont l'habitat naturel est le sol. La possibilité de résister à la substance qu'ils excrètent confère aux bactéries productrices un avantage sélectif considérable [22]. L'acquisition, par les bactéries sensibles du sol, de mécanismes leur permettant de résister à ces substances a permis à cet écosystème d'atteindre un état d'équilibre. Certaines bactéries ont pu développer des systèmes de défense originaux. Il a ainsi été suggéré que certaines bêta-lactamases dérivent de la D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, enzyme impliquée dans la synthèse du peptidoglycane [23]. D'autres bactéries ont pu simplement acquérir des gènes de résistance déjà présents chez les microorganismes producteurs

RÉFÉRENCES

13. Meyer TE, Cusanovitch MA, Kamen MD. Evidence against use of bacterial amino acid sequence data for construction of all-inclusive phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 217-20.
14. Courvalin P, Weisblum B, Davies J. Aminoglycoside-modifying enzyme of an antibiotic-producing bacterium acts as a determinant of resistance in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 999-1003.
15. Thompson CJ, Skinner RH, Thompson J, Ward JM, Hopwood DA, Cundliffe E. Biochemical characterization of resistance determinants cloned from antibiotic-producing Streptomycetes. *J Bacteriol* 1982 ; 151 : 678-85.
16. Vining LC. Antibiotic tolerance in producer organisms. *Adv Appl Microbiol* 1979 ; 25 : 147-68.
17. Cundliffe E. Self defence in antibiotic-producing organisms. *Br Med Bull* 1984 ; 40 : 61-7.
18. Dowding JE. Susceptibility to butirosin and neomycin B in *Bacillus circulans*, the butirosin-producing organism. *J Gen Microbiol* 1979 ; 115 : 385-9.
19. Komatsu K, Le Boul J, Harford S, Davies J. Studies of plasmids in neomycin-producing *Streptomyces fradiae*. In : Schlessinger D, ed. *Microbiology-1981*. Washington : American Society for Microbiology. 1981 : 384-7.
20. Majumdar MK, Majumdar SK. Relationship between alkaline phosphatase and neomycin formation in *Streptomyces fradiae*. *Biochem J* 1971 ; 122 : 397-404.
21. Okanishi M, Hotta K. Regulation of antibiotics production in microorganisms. In : Sakaguchi K, Okanishi M, eds. *Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms*. Tokyo : Kodansha Ltd, 1980 : 25-7.
22. Demain A, Piret JA. Why secondary metabolism ? In : Schlessinger D, ed. *Microbiology-1981*. Washington : American Society for Microbiology, 1981 : 363-66.
23. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of actions of penicillins : a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965 ; 54 : 1133-41.
24. Uchiyama H, Weisblum B. N-methyl transferase of *Streptomyces erythraeus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics : amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci. *Gene* 1985 ; 38 : 103-10.
- d'antibiotiques. Ce pourrait être le cas pour certains mécanismes de résistance aux aminosides (APH et AAC), mais également pour la résistance aux antibiotiques de la famille des macrolides, lincosamides et streptogramines B (MLS_B). Dans ce cas, la résistance est due à la méthylation d'un résidu adénine de l'ARN 23S de la grande sous-unité ribosomale. Cette activité enzymatique a été mise en évidence chez *Streptomyces erythraeus*, le microorganisme producteur d'érythromycine, mais également chez *Bacillus licheniformis*, une bactérie du sol, ainsi que chez les cocci à Gram positif pathogènes pour l'homme. Il a été récemment montré que les séquences peptidiques de ces différents méthylases étaient fortement homologues [24]. De nombreux auteurs ont suggéré que les bactéries du sol aient ainsi constitué un réservoir de gènes de résistance plasmidique ou transposable. L'utilisation des antibiotiques à partir des années 1950 est sans aucun doute responsable de la dissémination des gènes de résistance des bactéries telluriques aux bactéries pathogènes qui, jusqu'à cette époque, étaient encore majoritairement sensibles à ces produits. Des bactéries telles qu'*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*... sont des intermédiaires épidémiques de choix pour le transfert des gènes de résistance des bactéries du sol aux bactéries pathogènes à Gram négatif, et plus particulièrement les entérobactéries. Chez les bactéries à Gram positif, *Bacillus* jouerait un rôle équivalent vis-à-vis des streptocoques et des staphylocoques.

Dissémination hétérogrammique des APH (3')

Depuis l'introduction des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, le problème de l'augmentation régulière de la résistance des bactéries se pose de manière chronique. Si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, il n'en a nullement

modifié la morbidité. Cet usage fréquent abusif est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec pour conséquence une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. L'une des principales causes de l'évolution de la résistance bactérienne est la dissémination de gènes de résistance à des genres bactériens auparavant uniformément sensibles. Le développement des techniques de recombinaison in vitro et de séquençage rapide de l'ADN rend possible la construction de sondes intragéniques* de divers déterminants de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Cette génothèque permet, par hybridation ADN/ADN, la détection et l'épidémiologie de la résistance. De telles études sont à l'origine des premières démonstrations de transfert in vivo de matériel génétique entre des microorganismes phylogéniquement distants. Ainsi, sur la base d'homologie structurale entre des gènes de résistance détectés chez les streptocoques et chez les staphylocoques, un échange facile des déterminants de résistance aux antibiotiques entre ces deux genres

GLOSSAIRE

Dissémination hétérogrammique : transfert d'information entre bactéries à coloration de Gram différente (Gram-positif et Gram-négatif).

Horloge moléculaire : hypothèse selon laquelle les protéines homologues évoluent à la même vitesse quelles que soient les contraintes exercées par l'environnement.

Plasmide autotransférable : plasmide qui possède l'information génétique nécessaire à son autotransfert par conjugaison.

Sonde intragénique : fragment d'ADN interne à un gène qui, après marquage avec un radioélément (³²P, ³⁵S, etc.), permet la détection de gènes identiques, ou structurellement apparentés, par hybridation ADN/ADN.

Transformation bactérienne : modification génétique héréditaire résultant de la pénétration d'une molécule d'ADN nu dans une bactérie.

res bactériens a été suggéré. Et ceci avant que le transfert inter-générique de plasmides de résistance par conjugaison n'ait été obtenu, dans les conditions du laboratoire, entre les genres *Streptococcus* et *Staphylococcus* [25, 26]. L'identité de séquence entre les gènes des structures des APH(3') de type III de staphylocoque et de streptocoque (figures 4 et 6) indique un transfert récent in vivo d'information génétique et illustre parfaitement la fluidité génomique existant entre ces groupes bactériens.

Les gènes issus des bactéries à Gram positif sont généralement exprimés chez les bactéries à Gram négatif alors que la réciproque (à de rares exceptions près) n'est pas vraie. Cette barrière à l'expression « hétérogramme » est due à une mauvaise traduction fréquemment associée à une mauvaise transcription. Pour ces raisons, nous avons envisagé l'émergence, chez les bactéries à Gram négatif, de gènes de résistance spécifiques des bactéries à Gram positif, et non l'inverse [27]. De fait, de tels transferts ont été récemment mis en évidence dans notre laboratoire.

Campylobacter est une bactérie à Gram négatif responsable d'entérite aiguë chez l'homme. La souche de *Campylobacter coli* BM2509 résistante à l'ampicilline, au chloramphénicol, à l'érythromycine, à la kanamycine, à la spectinomycine, à la streptomycine et à la tétracycline, a été isolée des selles d'une malade présentant une diarrhée acquise au cours de son hospitalisation. La résistance à la kanamycine n'avait jamais été décrite chez *Campylobacter*. Sur la base de profils de substrats réalisés in vitro, cette résistance apparaissait comme étant due à la synthèse constitutive d'une APH(3') de type III dont le gène de structure était porté par un plasmide autotransférable de 47 kilobases pIP1433 [28]. Comme nous l'avons préalablement mentionné, cette enzyme était jusqu'alors spécifique des cocci à Gram positif. Le gène de structure de l'APH(3')-III de pIP1433

a été entièrement séquencé [29] et s'est avéré être identique aux gènes des APH(3')-III détectés chez les cocci à Gram positif (*Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Pneumococcus*) (figure 6). La présence de gènes identiques chez des bactéries aussi distantes au plan phylogénique indique que l'émergence de la résistance à la kanamycine chez *Campylobacter* résulte d'un transfert récent d'information génétique entre les bactéries à Gram positif et le genre *Campylobacter* dans les conditions naturelles.

La mise en évidence chez *Campylobacter* d'une enzyme qui semblait jusqu'alors confinée aux bactéries à Gram positif pose le problème de son mode d'acquisition. Deux hypothèses peuvent être avancées en ce qui concerne la nature du matériel génétique transmis. La première, celle d'une épidémie plasmidique, implique que pIP1433 soit un plasmide exogène récemment acquis par *Campylobacter*. La seconde, celle d'une épidémie génique, implique que pIP1433 soit un plasmide endogène au genre *Campylobacter* ayant

récemment acquis un fragment d'ADN exogène, éventuellement un élément transposable, portant le gène de structure de l'APH(3')-III. Des expériences d'hybridation ADN/ADN ont montré que la structure de pIP1433 était étroitement apparentée à celle de plasmides résidents du genre *Campylobacter*. Par ailleurs, ce plasmide est maintenu de façon stable dans son hôte d'origine, *C. coli* BM2509, et peut être transféré efficacement par conjugaison à d'autres espèces de *Campylobacter* chez qui il est également stable. Les systèmes répliatif et conjugatif de pIP1433 apparaissent donc particulièrement bien adaptés au genre *Campylobacter*. L'ensemble de ces observations milite en faveur de l'hypothèse d'une épidémie génique.

Il est vraisemblable que l'échange d'information génétique entre des bactéries éloignées phylogéniquement se fasse par transformation, la physiologie de la conjugaison et de la transduction apparaissant beaucoup trop spécifique. Chez l'homme et l'animal, le lieu privilégié de rencontre entre *Campy-*

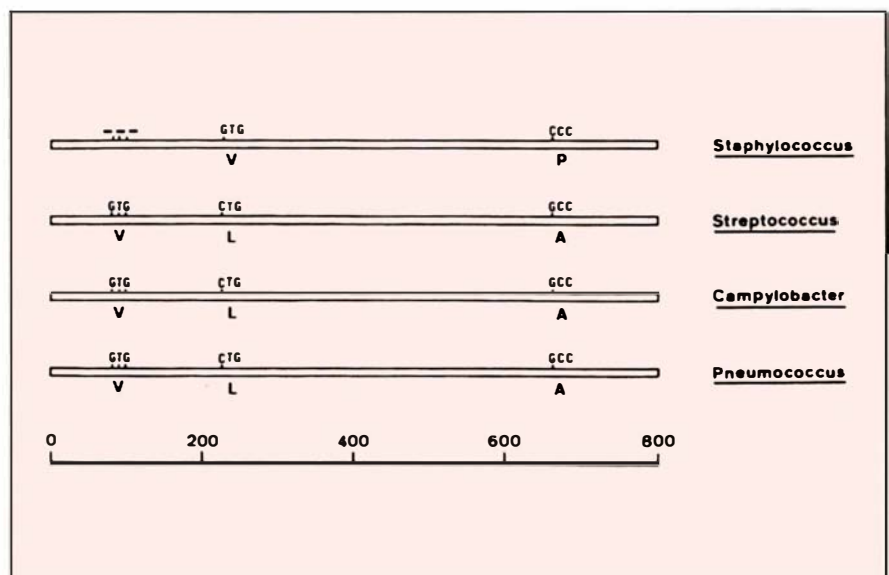


Figure 6. **Comparaison schématique des séquences nucléotidiques des gènes de structure des APH(3')-III de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Campylobacter* et *Pneumococcus*.** Seuls les codons substitués ou délétés (-), ainsi que les changements d'acides aminés correspondants ont été indiqués. L'échelle au bas de la figure est en paire de bases.

lobacter et les cocci à Gram positif, *Streptococcus faecalis* par exemple, est le tube digestif. La variété et le nombre de microorganismes s'y développant, notamment au niveau du colon, mais surtout l'abondance de la lyse cellulaire, sont des facteurs favorables au transfert in vivo de gènes par un mécanisme apparenté à la transformation*. A ce jour, cependant, toutes les expérimentations réalisées dans le but de reproduire de tels transferts hétérogramiques se sont révélées infructueuses. Il apparaît donc clairement que l'utilisation des antibiotiques, telle qu'elle est pratiquée actuellement dans certains écosystèmes (hôpital, élevage, agriculture), crée des pressions de sélection qui permettent l'accomplissement d'événements exceptionnels que nous sommes encore incapables de reproduire dans les conditions du laboratoire. Cette assertion a été récemment étayée par la mise en évidence du gène de la méthylase ribosomale spécifique des cocci à Gram positif, enzyme qui confère la résistance aux MLS_B, dans des souches d'*Escherichia coli* isolées chez des patients traités avec de l'érythromycine [30].

Conclusion

Le développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques constitue un problème de santé grave et rapidement évolutif. Afin d'y remédier, et pour découvrir des molécules plus actives, l'industrie pharmaceutique recherche sans cesse de nouveaux antibiotiques par criblage systématique des souches productrices de métabolites secondaires. Cet article montre qu'il est important également d'étudier les mécanismes de résistance présents chez les souches productrices afin de pouvoir prédire ceux qui seront rencontrés au cours de l'usage thérapeutique des produits qu'elles synthétisent. Connaissant ces mécanismes de résistance, il sera possible de modifier chimiquement les antibiotiques, en anticipant l'émergence en clinique de souches bactériennes résistantes

Summary

3'-Aminoglycoside phosphotransferases [APH(3')] were chosen as a model to study the evolution and the transfer of aminoglycoside resistance genes under natural conditions. APH(3') catalyses the phosphorylation of the hydroxyl group in position 3' of aminohexose I of kanamycin and structurally related antibiotics. Five types of APH(3') can be distinguished on the basis of their substrate range *in vitro*. Comparison of the amino acid sequences of APH(3') enzymes from transposons Tn903 (type I) and Tn5 (type II) detected in Gram-negative bacteria, from the Gram-positive *Staphylococcus* and *Streptococcus* (type III), and from the butirosin-producing *Bacillus circulans* (type IV) and a neomycin-producing *Streptomyces fradiae* (type V) indicate that they have diverged from a common ancestor. These structural data support the hypothesis that the antibiotic-producing strains were the source of certain resistance determinants. *Campylobacter coli* and *C. jejuni* are Gram-negative bacteria frequently responsible for bacterial acute gastroenteritis in humans. *C. coli* strain BM2509 multiresistant to antibiotics, including kanamycin, was isolated from the faeces of a patient with hospital acquired diarrhoea. Kanamycin resistance was novel in *Campylobacter*. Analysis of extracts from BM2509 indicated that resistance to kanamycin and structurally related antibiotics was due to the synthesis of an APH(3') of type III, an enzyme not detected previously in a Gram-negative bacterium. The genes encoding APH(3')-III in *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* and *Staphylococcus* are identical. These findings constitute evidence for a recent *in vivo* transfer of genetic information between Gram-positive and Gram-negative bacteria.

RÉFÉRENCES

25. Engel HW, Soediman N, Rost JA, Van Leeuwen WJ, Van Embden JD. Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistances between group A, B, and D streptococci, *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol* 1980 ; 142 : 407-13.
26. Schaberg D, Clewell DB, Glatzer L. Conjugative transfer of R plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982 ; 22 : 204-7.
27. Davies J, Courvalin P, Berg D. Thoughts on the origins of resistance plasmids. *J. Antimicrob Chemother* 1977 ; 3(Suppl.C) ; 7-17.
28. Lambert T, Gerbaud G, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in Gram-positive cocci. *Ann Microbiol (Paris)* 1985 ; 136B : 135-50.
29. Trieu-Cuot P, Gerbaud G, Lambert T, Courvalin P. In vivo transfer of genetic information between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *EMBO J* 1985 ; 4 : 3583-7.
30. Trieu-Cuot P, Arthur M, Courvalin P. Transfer of genetic information between Gram-positive and Gram-negative bacteria under natural conditions. In : Curtiss III R, Ferretti J, eds. *Genetics of Streptococci*. Washington : American Society for Microbiology, 1986 (sous presse).

TIRÉS A PART

P. Trieu-Cuot : unité des agents antibactériens, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15.