Journal de la Société de Biologie, 197 (4), 389-396 (2003)

Taux de mutation et adaptation des bactéries au tube digestif

par Antoine Giraud[1], Michel Fons[2] & François Taddei[1]

[1] *Génétique Moléculaire Évolutive et Médicale, INSERM U571, Faculté de Médecine « Necker-Enfants Malades », 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France. e-mail: taddei@necker.fr*

[2] *Institut Méditerranéen de Recherche en Nutrition, Faculté des Sciences et Techniques de Marseille Saint-Jérôme, Avenue escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France*

Reçu le 18 juin 2003

RÉSUMÉ

Pour étudier le rôle des bactéries mutatrices dans l'évolution des populations bactériennes, nous avons utilisé un modèle de souris à flore contrôlée. Cette étude a été réalisée en observant, chez la bactérie *Escherichia coli*, d'une part l'impact de la fréquence d'apparition des mutations sur la colonisation du tube digestif, un des environnements naturels de cette espèce, et, d'autre part, l'évolution du taux de mutation des populations bactériennes dans cet écosystème.

Nous avons pu montrer que les bactéries mutatrices ont un avantage sur des bactéries sauvages lors de la colonisation du tube digestif. Cet avantage vient de leur capacité à générer plus rapidement les mutations adaptatives qui vont assurer leur maintien dans l'écosystème. Parallèlement à cette spécialisation à l'environnement où ils se trouvent, les mutateurs accumulent des mutations neutres qui peuvent s'avérer délétères ou létales dans un environnement secondaire.

En suivant l'évolution du taux de mutation de souches d'*E. coli* inoculées à des souris recevant une antibiothérapie, nous avons montré qu'en sélectionnant des mutants portant des allèles de résistance, une antibiothérapie sélectionne simultanément des allèles qui augmentent le taux de mutation des souches bactériennes.

Le coût pour les bactéries mutatrices dû à l'accumulation de mutations s'observe si elles se trouvent dans un environnement où les changements sont récurrents ou si elles évoluent à travers un nombre limité d'environnements stables. Dans un environnement où chaque changement est original, les bactéries mutatrices pourraient alors apporter une réponse adaptative. Chaque environnement naturel est associé à des pressions de sélection et à des conditions écologiques spécifiques qui vont probablement favoriser la sélection d'un taux de mutation plutôt qu'un autre.

SUMMARY Impact of mutation rate on bacterial adaptation

To study the role of mutator bacteria in the evolution of bacterial populations, we followed the impact of the mutation rate of *Escherichia coli* strains in the colonisation of the gut of axenic mice and the evolution of the mutation rate of bacterial populations living in the gut.

We show that mutator bacteria have an advantage during the colonization. This adaptive advantage comes from their ability to generate adaptive mutations faster than wild type strains, mutations that allow their maintenance in the ecosystem. However, while mutator bacteria are becoming specialised to the environment they are living in, they accumulate mutations that may be deleterious or lethal in secondary environments.

By following the evolution of the mutation rate of bacterial populations living in the gut of mice receiving antibiotics, we show that this therapy selects not only for antibiotic resistant mutants but also for mutator alleles that enhance mutation rates and are responsible for the appearance of the resistance.

The costs of a high mutation rate, due to the accumulation of mutations, is seen in environments where changes are recurrent. In an ever-changing situation where every change is new, mutator bacteria might help the evolution of bacterial populations.

MUTATIONS, ÉVOLUTION ET BACTÉRIES MUTATRICES

Mutations, la vision classique

Les mutations sont généralement regroupées en plusieurs types, en fonction de leur influence sur la valeur sélective qui leur est associée. On appelle mutations neutres l'ensemble des mutations qui ne sont pas associées à une variation de valeur sélective. Les mutations délétères sont celles qui sont associées à une réduction de cette valeur. Les mutations avantageuses ou adaptatives sont associées à une augmentation de la valeur sélective. Cette valeur est intimement liée à l'environ-

nement dans lequel se trouve l'individu portant la mutation. Par exemple, dans le cas des bactéries, certaines mutations conférant la résistance à la rifampicine ralentissent la vitesse de transcription de l'ADN. Une bactérie portant cette mutation peut donc être défavorisée par rapport aux autres dans un environnement sans antibiotiques où les bactéries se développent rapidement. Ce désavantage sera probablement réduit dans un environnement où la vitesse de croissance est faible, il deviendra un avantage dans un environnement contenant de la rifampicine. Généralement on estime que les mutations sont néfastes car principalement délétères ou létales. Chez *E. coli* le taux de mutations est estimé à 10^{-10} par paire de bases (Lenski, 1992). La majorité de ces mutations sont silencieuses ou neutres. La fréquence des mutations délétères a été estimée dans différents systèmes expérimentaux et est comprise entre $1{,}7.10^{-4}$ et $1{,}6.10^{-3}$ (Kibota & Lynch, 1996 ; Keightley & Eyre-Walker, 1999) et celle des mutations létales de l'ordre de 10^{-5} (Taddei *et al.*, 1997). Pour cette raison, il est nécessaire pour chaque individu de pouvoir maintenir le plus possible l'intégrité de son génome. De ce fait, on a longtemps considéré le taux de mutation minimal comme le meilleur (Kimura, 1967). Cette proposition a été consolidée par la découverte de la fixité du taux de mutations par génome (une mutation pour 300 génomes répliqués pour les micro-organismes à ADN (Drake, 1991) et celle de nombreux mécanismes antimutateurs. Ces systèmes impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique et de sa transmission sont retrouvés chez tous les organismes vivants depuis les bactéries jusqu'à l'Homme (Wood *et al.*, 2001) et interviennent à tous les niveaux de la biochimie de l'ADN.

Certains agissent indirectement en protégeant l'ADN des agents pouvant créer des modifications en les éliminant de la cellule. D'autres mécanismes enzymatiques contrôlent la qualité des bases disponibles pour la synthèse d'ADN et le bon état de l'ADN présent dans les cellules, et le réparent si nécessaire. Par ailleurs, la fidélité de polymérisation des ADN polymérases responsables de la réplication de l'ADN est primordiale pour que l'information génétique soit correctement transmise aux descendants (Petruska & Goodman, 1985 ; Echols & Goodman, 1991).

E. coli a accumulé un grand nombre de systèmes de réparation. Cette accumulation de mécanismes parfois redondants est en accord avec l'idée que les mutations sont avant tout un frein au développement cellulaire. Les contraintes empêchant d'atteindre un taux de mutation nul sont la rapidité de la réplication et le coût énergétique des systèmes antimutateurs plus efficaces (Drake, 1991). De plus, les mutations sont, avec le transfert horizontal d'ADN, la seule possibilité d'augmenter la variabilité génétique. Cette valeur minimale du taux de mutation pourrait être suffisante pour fournir la variabilité génétique sur laquelle agit la sélection naturelle.

La mutation, un carburant de l'évolution

L'évolution peut en effet être considérée comme le résultat d'un tri effectué par la sélection naturelle parmi les mutations apparues de manière aléatoire dans une population à chaque nouvelle génération.

Les théories de l'évolution tentent de décrire les processus évolutifs responsables de l'existence de la diversité biologique. Comme ces processus sont actifs en permanence, l'évolution peut s'étudier expérimentalement au laboratoire (Lenski, 1992). L'évolution est, par définition, dynamique et ne peut s'étudier en s'affranchissant d'un paramètre temporel. Une étude portant sur l'évolution des populations doit non seulement prendre en compte un grand nombre d'individus mais aussi de générations. Ces limites ont restreint les expériences d'évolution à l'observation de populations d'individus ayant un temps de génération court et dont on peut facilement entretenir une population nombreuse.

Les bactéries possèdent ces deux avantages et un avantage supplémentaire vient de la possibilité d'arrêter leur évolution, sans les tuer, en les congelant. Ainsi, il est possible de comparer la valeur sélective d'une bactérie ou d'une population ayant évolué dans un milieu de culture pendant plusieurs générations avec celle de son ancêtre conservé au froid.

Grâce aux modèles bactériens, pionniers dans la compréhension de nombreux systèmes biologiques, il est aussi possible d'étudier *in vivo* les mécanismes de l'évolution.

Les organismes vivants sont en permanence confrontés à des variations de l'environnement dans lequel ils résident ou à des changements d'environnement. Ils doivent donc mettre en œuvre des stratégies leur permettant de s'adapter à ces modifications. Ils possèdent des mécanismes qui leur permettent de répondre aux variations environnementales.

Les principaux facteurs environnementaux susceptibles de varier sont la nature et l'abondance des nutriments présents, la pression osmotique, la température, le pH, etc. Ils peuvent varier dans de vastes gammes de valeur. Cependant, au sein d'un même écosystème et dans une niche donnée, ces variations sont probablement plus faibles. Comme chaque espèce de bactérie ne se développe que dans un nombre restreint de milieux, elle ne rencontrera qu'un nombre limité de combinaisons de ces différents paramètres. De ce fait, l'action simultanée de seulement quelques systèmes de régulation de l'expression génétique, en réponse aux variations environnementales, peut suffire à assurer la survie et la permanence d'une espèce dans son environnement primaire, mais aussi dans les environnements secondaires qu'elle est susceptible de rencontrer.

Les populations bactériennes confrontées de manière prolongée à un environnement défavorable au sein duquel les mécanismes intervenant normalement dans la régulation de l'expression de leurs gènes ne leur permettent pas de fournir une réponse adaptative adéquate risquent l'extinction. Les mécanismes existants se révélant inefficaces, il est alors indispensable d'en « inventer » de nouveaux pour survivre.

Il a été montré que le taux de mutation des bactéries n'était pas constant, mais pouvait varier d'une souche à l'autre. Il existe des mécanismes capables de faire varier

le taux de mutation des individus qui les portent. Ces mécanismes sont eux-mêmes sous contrôle de facteurs génétiques, et sont, comme les autres, soumis à la variation (la mutation), donc susceptibles d'évoluer, et soumis à la sélection. Comme ils ont été retenus au cours de l'évolution, leur existence a modifié la vision classique que l'on avait des mutations, car ils remettent en cause l'hypothèse selon laquelle le taux de mutation doit être minimal. Muter plus pourrait être une manière de s'adapter à un éventuel changement d'un paramètre physicochimique du milieu dans lequel une cellule réside. Une population possédant un polymorphisme génétique important pourrait augmenter ses chances de persister dans un écosystème qui évolue.

Des systèmes générateurs de mutations

On peut distinguer les systèmes générateurs de mutation en fonction de leur action dans le temps et dans l'espace. Celle-ci peut s'appliquer à tout ou seulement à certaines parties du génome, être le résultat d'un stimulus de l'environnement ou être active en permanence indépendamment des conditions extérieures. On parle alors selon le cas de mutagenèse localisée ou généralisée, inductible ou constitutive (Tableau I).

La présence de répétitions successives d'une courte séquence d'ADN (de 1 à quelques nucléotides seulement) peut être à l'origine de glissements de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN, (Levinson & Gutman, 1987) et provoquer l'ajout ou le retrait d'un ou de quelques nucléotides. Comme elle dépend de la séquence d'ADN, la fréquence d'apparition des mutations n'est pas distribuée uniformément sur le génome. Ces séquences considérées comme des points chauds de mutation sont des systèmes mutateurs constitutifs localisés. Il sont retrouvés dans les loci de contingence qui sont largement représentés sur le génome de certaines bactéries pathogènes (Moxon *et al.*, 1994).

Dans certaines conditions de stress, l'environnement peut induire une augmentation de la fréquence de mutation même en l'absence de source exogène de lésion de l'ADN (Taddei *et al.*, 1995). Il est alors question de mutagenèse inductible. Le cas le plus étudié est lié à l'augmentation transitoire du taux de mutation dans des populations bactériennes en condition de carence (Rosenberg *et al.*, 1998 ; Foster, 2000 ; Rosenberg, 2001).

TABLEAU 1. – Exemple des différents types de mécanismes mutateurs en fonction de leur action dans le temps et dans l'espace.

Types de mutateurs		Temps	
		Inductibles	Constitutifs
Espace	Localisés	Eléments mobiles	Séquences répétées
	Généralisés	Réponse SOS	Inactivation des systèmes de réparation de l'ADN

Le déplacement d'éléments mobiles présents dans le génome des bactéries peut dépendre des conditions environnementales (Eichenbaum & Livneh, 1998). Ils peuvent provoquer l'apparition de mutations à la fois au site qu'ils quittent ainsi qu'à celui dans lequel ils s'insèrent (Chao & Cox, 1983). Si le site d'insertion est défini par une séquence précise d'ADN, alors l'augmentation de la mutagenèse est induite et localisée.

La réponse SOS est un mécanisme mutateur inductible généralisé. Elle intervient dans la réparation de l'ADN et est induite chez *E. coli* par la présence de cassures de l'ADN. La réparation se fait par différents mécanismes dont des polymérases capables de restaurer une molécule d'ADN fonctionnelle en passant outre les lésions. Cependant, cette réparation se fait parfois en introduisant une mutation. Les polymérases induites en condition de réponse SOS ont ainsi une activité mutatrice (Radman, 1999). Dans ce cas, la mutagenèse induite est généralisée à l'ensemble du génome.

L'existence de tels systèmes a modifié la vision classique que l'on avait des mutations. La sélection associée au milieu où se trouvent les bactéries va retenir le taux de mutation de la population ayant la valeur adaptative la plus forte. Ce taux n'est pas constant, mais varie avec les conditions de vie des cellules.

Bactéries mutatrices

La perte, ou la modification, d'un des systèmes impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique peut entraîner pour la cellule une augmentation de la fréquence à laquelle elle génère des mutations. On parle alors de phénotype mutateur constitutif généralisé et on qualifie communément de mutatrices les cellules ayant un taux de mutation spontané élevé (on définit un allèle mutateur comme la forme d'un gène qui provoque une augmentation du taux de mutation de la cellule).

Incidence des bactéries mutatrices dans les isolats naturels

Plusieurs articles rapportent la présence de bactéries mutatrices dans des isolats naturels bactériens. Les observations faites sur des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2000), de salmonelles (LeClerc *et al.*, 1996), ou d'*E. coli* montrent qu'en fonction des souches et de leur provenance il y a entre un et quelques dizaines de pour cent de bactéries mutatrices. (Treffers *et al.*, 1954 ; Jyssum, 1960 ; Gross & Siegel, 1981 ; LeClerc *et al.*, 1996 ; Matic *et al.*, 1997). Ces proportions sont trouvées chez les bactéries commensales comme chez les pathogènes. Ces études ont montré qu'environ un pour cent des souches isolées avait un taux de mutation cent fois supérieur à celui attendu dû à une inactivation du système de réparation des mésappariements de base (SRM) par la présence de mutations dans les gènes *mutS* et *mutL* (LeClerc *et al.*, 1996 ; Matic *et al.*, 1997 ; Oliver *et al.*, 2000)

Cette fréquence est environ cent fois supérieure à la fréquence attendue compte tenu de la probabilité d'appa-

rition d'une mutation conférant un caractère mutateur (LeClerc *et al.*, 1996 ; Taddei *et al.*, 1997 ; Boe *et al.*, 2000). Ces observations une fois encore remettent en cause la nécessité d'un taux de mutation le plus faible possible, et suppose la possibilité d'un avantage sélectif pour les allèles mutateurs.

La sélection des mutateurs constitutifs

On ne peut écarter le fait que la sélection des mutateurs constitutifs se fasse pour l'absence du mécanisme de réparation de l'ADN ou pour une conséquence de cette absence. Il a été suggéré par exemple que ces mutations pourraient augmenter la vitesse de la réplication en diminuant sa fidélité. Cependant, dans la majorité des études d'évolution expérimentale, la sélection de bactéries mutatrices ne semble pas directe mais due à une sélection de second ordre (Tenaillon *et al.*, 2001). Plus que pour une meilleure adaptation à un environnement donné, les mutateurs sont sélectionnés pour leur capacité à générer de la diversité génétique par les mutations adaptatives présentes au sein de cette diversité. La sélection associée au milieu dans lequel se trouvent les cellules va retenir le taux de mutation de l'individu ayant la valeur adaptative la plus forte. Ce taux n'est donc pas obligatoirement minimal. De même, il n'est pas obligatoirement optimal, dans le sens où il ne garantit pas une meilleure adaptabilité aux cellules.

De nombreux travaux ont été réalisés pour mieux comprendre le rôle évolutif des bactéries mutatrices. Des observations expérimentales et des études théoriques ont montré qu'effectivement, si le caractère mutateur diminue les chances de survie de l'individu qui le porte, il est en revanche un avantage sélectif au niveau d'une population clonale (Nestmann & Hill, 1973 ; Cox & Gibson, 1974 ; Painter, 1975). Être mutateur est donc un handicap au niveau d'une cellule car la probabilité de générer des mutations altérant la valeur sélective est élevée. En revanche, une population composée d'individus mutateurs a plus de chances de survivre à différentes pressions de sélection qu'une population d'individus ayant un taux de mutation plus faible. Le passage du désavantage individuel à l'avantage de la population fonde le paradoxe des mutateurs (Lenski, 1992). Plus récemment, deux études ont montré que la possibilité de sélectionner des souches mutatrices au sein de populations ayant un taux de mutation bas (Sniegowski *et al.*, 1997 ; Taddei *et al.*, 1997).

TAUX DE MUTATION ET ADAPTATION DES BACTÉRIES AU TUBE DIGESTIF

Les travaux sur les mutateurs décrits ci-dessus se sont limités soit à la recherche de la présence de mutateurs dans la nature soit à l'étude de leur impact sur l'évolution d'une population bactérienne *in vitro*. Parmi les travaux réalisés *in vitro*, l'environnement des bactéries étudiées a toujours été une culture de laboratoire, dans un milieu stable. Nous avons voulu développer une nouvelle dimension à l'étude du rôle des bactéries mutatrices dans l'évolution des populations bactériennes en étudiant une souche bactérienne dans son environnement primaire.

Nous avons ainsi étudié expérimentalement l'impact du taux de mutation de souches d'*E. coli* sur la colonisation du tube digestif de souris à flore contrôlée. Ces animaux, exempts de tout microorganisme, vivent dans des isolateurs qui les protègent de toute contamination extérieure. Les seules bactéries qu'ils peuvent rencontrer sont celles que l'expérimentateur introduit dans l'isolateur (Fig. 1). Ce modèle reste, bien sûr, un outil simplifié par rapport aux conditions naturelles où *E. coli* cohabite avec plus de 400 espèces dans l'intestin, mais néanmoins il est plus écologiquement rationnel et permet d'approcher les conditions de la colonisation originelle du tube digestif de manière contrôlée et reproductible. A l'aide de ce modèle, nous avons étudié si la fréquence de mutation d'une souche bactérienne peut affecter sa capacité à coloniser le tube digestif et quels sont les coûts et bénéfices liés à un taux de mutation élevé.

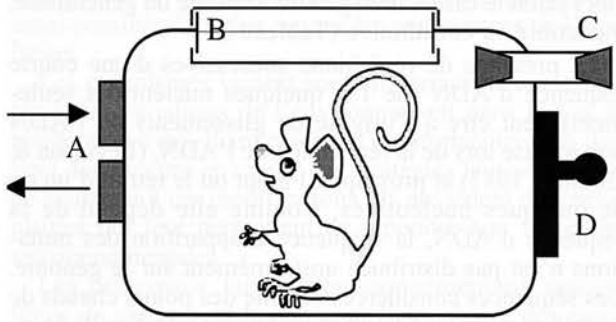

FIG. 1. – *Schéma d'un isolateur*. Les souris sont hébergées dans une enceinte stérile ventilée à travers des filtres (A). L'isolateur est équipé de différents systèmes de sas stérilisables (B : sas, C : tubulure et D : porte rapide) permettant l'introduction et la sortie de matériel sans rompre la stérilité de l'enceinte.

Avantage des bactéries mutatrices

La première partie des travaux a consisté à inoculer à des souris deux souches d'*E. coli*, l'une sauvage, l'autre mutatrice dont nous avons inactivé le gène *mutS*, ces souches étant isogéniques par ailleurs. Une première compétition est réalisée en inoculant à chaque souris environ 1×10^4 bactéries de chaque type. Ces deux populations se développent et colonisent le tube digestif. Peu à peu la population sauvage ne représente plus qu'une très faible part de la population totale et les mutateurs s'implantent durablement (Fig. 2).

Si l'avantage des mutateurs est dû à leur capacité à générer rapidement des mutations adaptatives plutôt qu'à un effet pléiotrope de l'allèle *mut*S- alors deux prédictions peuvent être faites :

– les caractères favorisant l'implantation dans le tube digestif doivent être transmissibles ;

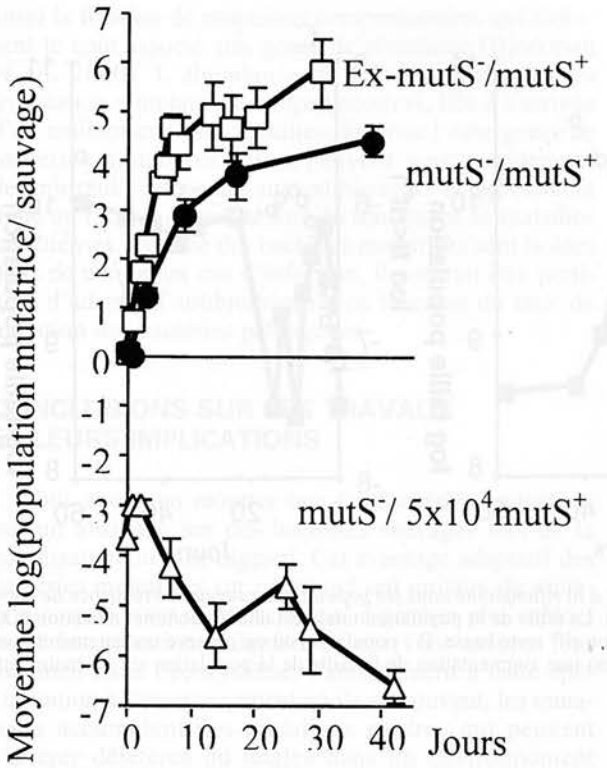

FIG. 2. – *Facteurs affectant la compétitivité de souches mutatrices*. Chaque point représente la moyenne du logarithme du rapport *mutS-/mutS+* mesuré dans chaque souris. Le jour 0, des souris axéniques sont inoculées soit avec $1,4 \times 10^4$ mutateurs et 1.6×10^4 sauvages (●), soit avec $6,3 \times 10^3$ mutateurs et $2,9 \times 10^7$ sauvages (Δ), soit avec $3,6 \times 10^4$ bactéries ayant passé 42 jours comme mutateur en compétition dont l'allèle *mutS-* a été restauré (Ex-*mutS-*) et $3,1 \times 10^4$ sauvages (❑).

– la taille de la population sauvage inoculée doit influencer l'issue de la compétition. En effet, la probabilité d'apparition d'une mutation donnée dans une population augmente donc avec le nombre de génomes répliqués, c'est-à-dire avec la taille de la population et sa vitesse de croissance.

Pour vérifier que les caractères à l'origine de l'élimination de la population sauvage sont héritables, un clone mutateur a été isolé de la population dominante à la fin de la compétition, et modifié afin de lui restituer un allèle *mutS* sauvage. Cette souche n'est donc plus mutatrice (Ex-*mutS-*). Elle a ensuite été mise en compétition avec une souche sauvage dans des conditions identiques à la première compétition. Dans ce cas, les différences entre les souches compétitrices sont l'ensemble des mutations acquises par les ancêtres de la souche reconstruite lors de leur séjour dans le tube digestif des souris. Cette compétition se solde de nouveau par une élimination de la souche sauvage (Fig. 2). Cette disparition ne peut plus ici être attribuée à l'allèle *mutS-* mais bien aux mutations générées par les souches mutatrices dont descend la souche préadaptée. De plus l'éviction du tube digestif de la population sauvage se fait plus tôt que dans la compétition de référence. La souche modifiée portant déjà les mutations nécessaires à sa victoire, le temps que ces ancêtres ont passé à les générer est gagné.

Pour vérifier l'influence de la taille de la population mutatrice sur son implantation, nous avons réalisé des compétitions où les mutateurs représentent non plus la moitié des bactéries inoculées aux souris mais 1/5000 de la population totale (Fig. 2). Comme dans la compétition 1/1, nous inoculons environ 1×10^4 bactéries mutatrices à chaque souris. Dans ce cas, c'est la population mutatrice qui est éliminée. Ces résultats confirment que l'avantage des bactéries mutatrices provient effectivement de leur capacité à générer des mutations adaptatives.

Par ailleurs nous avons étudié l'évolution du taux de mutation des populations bactériennes inoculées avec une souche d'*E. coli* soit mutatrice (*mutS-*) soit sauvage (*mutS+*). Pour cela nous avons suivi la fréquence d'apparition d'une mutation conférant la résistance à la rifampicine ($fRif^R$).

Durant les premiers jours de la colonisation, nous avons observé une augmentation transitoire de la $fRif^R$ (Fig. 3). Cette augmentation s'observe aussi bien pour les populations mutatrices que sauvages. Les premiers jours de colonisation passés, généralement, le taux de mutation se stabilise (Fig. 3A).

Nous avons alors pu observer l'émergence de bactéries mutatrices dans certaines populations sauvages, ainsi que celle de bactéries hypermutatrices au sein des populations mutatrices. Dans la plupart des cas, nous observons des fluctuations de la taille de la population résistante à la rifampicine. Ces augmentations transitoires peuvent être plus ou moins longues en fonction des populations (Fig. 3B et C). Dans ce cas, nous n'avons pas recherché la présence d'une population mutatrice émergente, bien qu'elle soit plausible et ait déjà été observée dans d'autres conditions (Notley-McRobb & Ferenci, 2000).

Coûts liés à un taux de mutation élevé

D'autre part, si nous avons pu détecter des clones ayant un taux de mutation réduit dans certaines populations mutatrices, en revanche nous n'avons jamais observé de réduction complète du taux de mutation de la population, même après 400 jours de colonisation, bien que l'inactivation du gène *mutS* soit due à une mutation ponctuelle et donc qu'un allèle sauvage puisse être restauré par une mutation reverse. Lors de ces études nous observons généralement un polymorphisme du taux de mutation, non seulement entre deux populations bactériennes présentes dans deux souris participant à la même expérience, mais aussi au sein d'une même population dans un tube digestif. Dans les conditions expérimentales, la pression de sélection pour un taux de mutation moins élevé doit donc être assez faible, les bactéries mutatrices ne semblent pas souffrir de leur taux de mutation élevé. Le coût lié à la génération de mutation délétère est probablement compensé par la taille de la population.

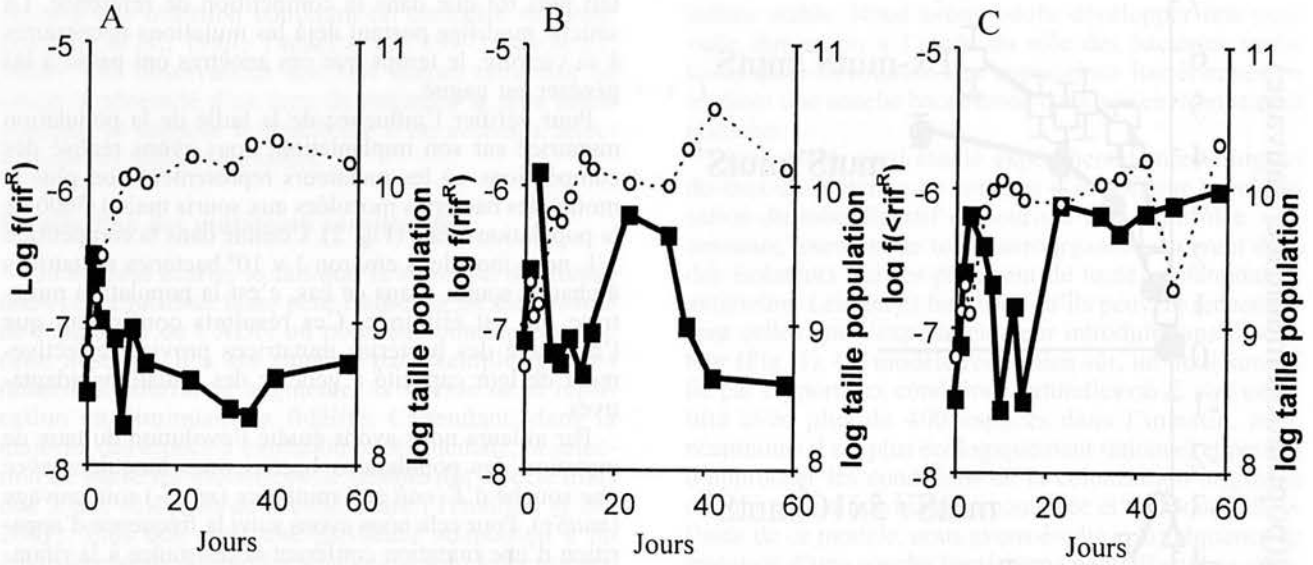

FIG. 3. – *Exemple d'évolution de la fréquence de bactéries résistantes à la rifampicine dans les populations sauvages*. Fréquence de bactéries résistant à la rifampicine dans la population (■, échelle de gauche). La taille de la population totale est donnée comme indication (○, trait pointillés, échelle de droite). A : Cas le plus fréquent où la population rif^R reste basse. B : population où on observe une augmentation transitoire de la population rif^R (5 cas observés sur 26). C : population où une augmentation de la taille de la population rif^R se maintient pendant plusieurs dizaines de jours (1 cas observé sur 26).

Nous avons aussi suivi l'apparition de mutations inactivant les gènes nécessaires à la synthèse des acides aminés. Ces mutations sont pour la plupart neutres dans le tube digestif où la disponibilité de ces métabolites est importante mais empêche la croissance des bactéries sur un milieu minimum. Nous avons pu observer que ces mutations s'accumulent rapidement dans les populations mutatrices, mais restent rares dans les populations sauvages (Fig. 4).

Ces résultats montrent qu'au cours de leur passage dans l'intestin, les mutateurs accumulent, en plus des mutations adaptatives, des mutations neutres dans cet environnement. Certaines peuvent ainsi entraîner la perte de caractères qui ne leur sont pas utiles dans cet environnement mais dont l'absence peut leur être fatale dans d'autres conditions. En fait le mutateur se spécialise peu à peu à l'environnement qu'il colonise et diminue ses chances de pouvoir en coloniser un autre même s'il y a déjà résidé. Si on considère le génome comme une mémoire des environnements déjà rencontrés, on peut considérer ces pertes de fonctions comme une amnésie génétique des mutateurs.

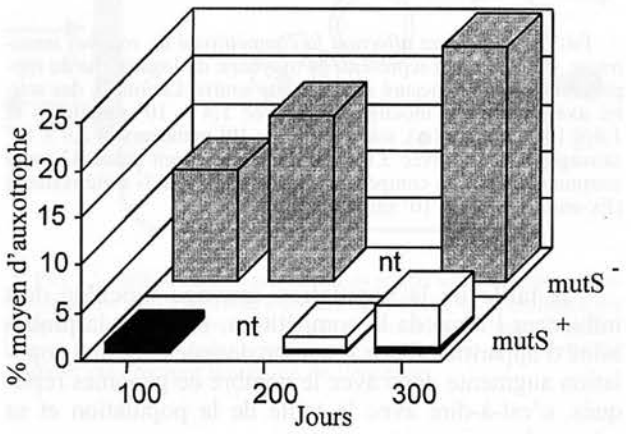

FIG. 4. – *Les bactéries mutatrices accumulent les mutations délétères*. Deux lots de souris ont été inoculées soit avec une souche d'*E. coli* mutatrice (*mut*S-), soit avec une souche sauvage (*mut*S+). À différent temps, 50 clones de chaque population ont été testés pour leur capacité à pousser sur milieu minimum et leur taux de mutation. Le pourcentage moyen d'auxotrophe est présenté en gris pour les populations issues d'un ancêtre mutateur. Pour les populations sauvages la partie noire de la colonne représente la part du pourcentage moyen d'auxotrophe dû à des clones dont le taux de mutation est resté bas et la partie blanche la part du pourcentage moyen d'auxotrophe dû à des clones mutateurs ayant émergé spontanément au sein de ces populations.

Impact des traitements antibiotiques sur la sélection de bactéries mutatrices

Nous avons aussi suivi l'évolution du taux de mutation de populations bactériennes résidant dans le tube digestif de souris auxquelles nous avons administré des traitements antibiotiques. Nous avons pu observer que la sélection imposée par l'antibiotique pouvait favoriser l'émergence de clones mutateurs et résistants au sein de ces populations. En sélectionnant des mutants portant des allèles de résistance, une antibiothérapie sélectionne simultanément des allèles qui augmentent le taux de mutation. Ces allèles sont probablement à l'origine de la génération des mutations conférant la résistance, ce qui augmente la probabilité d'échec d'un nouveau traitement (Giraud *et al.*, 2002). Un taux de mutation élevé favorise

aussi la fixation de mutations compensatoires qui réduisent le coût associé aux gènes de résistance (Bjorkman *et al.*, 2000). L'abondance de mutations adaptatives (résistance + mutations compensatoires), liée à l'arrivée d'un antibiotique dans le milieu, favorise l'émergence de bactéries mutatrices. Elles peuvent ainsi rapidement devenir multi-résistantes aux antibiotiques et représentent donc un facteur de risque lors du traitement de maladies infectieuses. Comme des bactéries mutatrices sont isolées dans de nombreux cas d'infection, il pourrait être pertinent d'adapter l'antibiothérapie en fonction du taux de mutation des bactéries pathogènes.

CONCLUSIONS SUR CES TRAVAUX ET LEURS IMPLICATIONS

Nous avons pu montrer que les bactéries mutatrices ont un avantage sur des bactéries sauvages lors de la colonisation du tube digestif. Cet avantage adaptatif des bactéries mutatrices sur celles qui ont un taux de mutation normal vient de leur capacité à générer plus rapidement les mutations adaptatives qui vont assurer leur maintien dans l'écosystème. Parallèlement à cette spécialisation à l'environnement où ils se trouvent, les mutateurs accumulent des mutations neutres qui peuvent s'avérer délétères ou létales dans un environnement secondaire (Giraud *et al.*, 2001).

Chaque environnement naturel est associé à une pression de sélection et à des conditions écologiques spécifiques qui vont probablement favoriser la sélection d'un taux de mutation plutôt qu'un autre. Le coût pour les bactéries mutatrices dû à l'accumulation de mutations s'observe si elles se trouvent dans un environnement où les changements sont récurrents ou si elles évoluent à travers un nombre limité d'environnements stables. Dans un environnement où chaque changement est original, alors les bactéries mutatrices pourraient apporter une réponse adaptative. L'arrivée successive de molécules antibactériennes dans le milieu, comme des antibiotiques ou des anticorps, peut créer ce type de conditions (Giraud *et al.*, 2002). C'est pourquoi il est possible que dans certaines pathologies les bactéries mutatrices aient un avantage sur des bactéries ayant un taux de mutation plus faible. Tel est vraisemblablement le cas de populations d'*E. coli* dans les infections urinaires (Denamur *et al.*, 2002) ou de *Pseudomonas aeruginosa* colonisant les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Oliver *et al.*, 2000). La sélection de mutateurs dépend de la force de la sélection imposée par l'environnement, et aussi de la taille et du nombre de générations de la population pendant l'infection. Dans les cas cités ci-dessus, les infections peuvent être longues, les populations sont généralement clonales, de taille importante et dans un milieu permettant une croissance rapide. Les mêmes contraintes pourraient expliquer que, dans d'autres types d'infections comme dans les pus, on trouve rarement de mutateurs, ou même que les souches isolées de septicémies aient un taux de mutation plus bas que la moyenne des isolats naturels (Denamur *et al.*, 2002).

BIBLIOGRAPHIE

Bjorkman J. *et al.*, Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*, 2000, *287 (5457)*, 1479-1482.

Boe L. *et al.*, The frequency of mutators in populations of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.*, 2000, *448 (1)*, 47-55.

Chao L. *et al.*, Competition between high and low mutation strains of *Escherichia coli*. *Evolution*, 1983, *37*, 125-134.

Cox E. C. *et al.*, Selection for high mutation rates in chemostats. *Genetics*, 1974, *77 (2)*, 169-184.

Denamur E. *et al.*, High frequency of mutators strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol.*, 2002, *184*, 605-609.

Drake J. W., A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, *88*, 7160-7164.

Echols H. *et al.*, Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, 1991, *60*, 477-511.

Eichenbaum Z. *et al.*, UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics*, 1998, *149 (3)*, 1173-1181.

Foster P. L., Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays*, 2000, *22 (12)*, 1067-1074.

Giraud A. *et al.*, Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, *46 (3)*, 863-865.

Giraud A. *et al.*, Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, 2001, *291*, 2606-2608.

Gross M. D. *et al.*, Incidence of mutator strains in *Escherichia coli* and coliforms in nature. *Mutat. Res.*, 1981, *91 (2)*, 107-110.

Jyssum K., Observations on two types of genetic instability in *Escherichia coli*. *Acta. Path.*, 1960, *48 (2)*, 113-120.

Keightley P. D. *et al.*, Terumi Mukai and the riddle of deleterious mutation rates. *Genetics*, 1999, *153 (2)*, 515-523.

Kibota T. T. *et al.*, Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*. *Nature*, 1996, *381 (6584)*, 694-696.

Kimura M., On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates. *Genetic. Research*, 1967, *9*, 23-34.

LeClerc J. E. *et al.*, High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science*, 1996, *274 (5290)*, 1208-1211.

Lenski R. E., Evolution, experimental. Encyclopedia of Microbiology. J. Lederberg. San Diego, Academic Press Inc. 1992, *2*, 125-140.

Levinson G. *et al.*, Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, *4 (3)*, 203-221.

Matic I. *et al.*, Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 1997, *277 (5333)*, 1833-1834.

Moxon E. R. *et al.*, Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr. Biol.*, 1994, *4 (1)*, 24-33.

Nestmann E. R. *et al.*, Population changes in continuously growing mutator cultures of *Escherichia coli*. *Genetics*, 1973, *73 (Suppl 73)*, 41-44.

Notley-McRobb L. *et al.*, Experimental analysis of molecular events during mutational periodic selections in bacterial evolution. *Genetics*, 2000, *156 (4)*, 1493-1501.

Oliver A. *et al.*, High frequency of hypermutable *pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 2000, *288 (5469)*, 1251-1254.

Painter P. R., Mutator genes and selection for the mutation rate in bacteria. *Genetics*, 1975, *79 (4)*, 649-660.

Petruska J. *et al.*, Influence of neighboring bases on DNA poly-

merase insertion and proofreading fidelity. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260 (12)*, 7533-7539.

Radman M., Enzymes of evolutionary change. *Nature*, 1999, *401 (6756)*, 866-867, 869.

Rosenberg S. M., Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, *2 (7)*, 504-515.

Rosenberg S. M. *et al.*, Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics*, 1998, *148 (4)*, 1559-1566.

Sniegowski P. D. *et al.*, Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature*, 1997, *387 (6634)*, 703-705.

Taddei F. *et al.*, cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, *92 (25)*, 11736-11740.

Taddei F. *et al.*, Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature*, 1997, *387 (6634)*, 700-702.

Tenaillon O. *et al.*, Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res. Microbiol.*, 2001, *152 (1)*, 11-16.

Treffers H. P. *et al.*, A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1954, *40*, 1064-1071.

Wood R. D. *et al.*, Human DNA repair genes. *Science*, 2001, *291 (5507)*, 1284-1289.

© *Société de Biologie, Paris, 2003.*

Le Directeur de la Publication : Jean SAVEL

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays.

La loi du 11 mars 1957, n'autorisant aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1er de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

Société de Biologie, Paris. — Dépôt légal : 2003. — N° d'ordre : 6. — 4e trimestre 2003

Imprimerie BARNÉOUD,
53960 Bonchamp-les-Laval. — N° 14323 Commission paritaire : n° 54174
Printed in France.