

II.

LE RÉCEPTEUR DE LA PÉNICILLINE
CHEZ LES BACTÉRIES,

par

J.M. GHUYSEN (*)

En 1940, Chain, Florey et leurs associés obtenaient pour la première fois la pénicilline G sous forme solide (quoique encore impure) et démontraient, chez les organismes supérieurs, son efficacité contre diverses bactéries pathogènes. Depuis lors, on sait que la pénicilline est douée d'une remarquable toxicité sélective. D'emblée, cette propriété suggérait que la pénicilline devait interférer avec l'une ou l'autre fonction spécifiquement bactérienne sans équivalent chez les cellules eucaryotes.

Structure du peptidoglycane des parois bactériennes
(Ghuysen, 1968; Schleifer and Kandler, 1972)

La cible attaquée par la pénicilline est un hétéropolymère particulier, appelé peptidoglycane, qui sert de support insoluble et rigide à la paroi des bactéries. Ce peptidoglycane est constitué de chaînes linéaires polysaccharidiques formées de résidus pyranosiques de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique reliés entre eux de façon alternée par des liaisons β (1 \rightarrow 4). Les groupements carboxyles des acides N-acétylmuramiques sont substitués par de courts tétrapeptides L-Ala- γ -D-Glu-L-R₃-D-Ala dans lesquels le résidu L-R₃ est, le plus souvent, un acide diaminé. Enfin, les tétrapeptides appartenant à des chaînes de glycane adjacentes sont reliés entre eux par des « ponts interpeptidiques » qui s'étendent entre le résidu D-alanine C-terminal d'un tétrapeptide et, le plus souvent, le groupement ω aminé du résidu L-R₃ d'un second tétrapeptide. Les peptidoglycanes pariétaux sont donc des structures réticulaires de taille énorme, entourant complètement la cellule bactérienne sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Acide N-acétylmuramique et acides aminés à configuration D sont des constituants spécifiquement bactériens.

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'art. 84 du Règlement.

Biosynthèse du peptidoglycane des parois bactériennes.
(Ghuysen and Shockman, 1973)

Une trentaine d'enzymes participent à la biosynthèse des peptidoglycane pariétaux. Certains d'entre eux sont cytoplasmiques (et solubles) et catalysent la synthèse de deux précurseurs uridyliques activés : l'uridine 5'-pyrophosphate (UDP)-N-acétylglucosamine et l'UDP-N-acétylmuramyl-L-Ala- γ -D-Glu-L-R₃-D-Ala-D-Ala. Le peptide de ce dernier précurseur n'est pas un tétrapeptide mais un pentapeptide se terminant par une séquence D-Ala-D-Ala.

Ces deux précurseurs sont ensuite pris en charge par un système multienzymatique membranaire qui, associé à un coenzyme lipidique particulier (un ester phosphorique d'un alcool polyisoprénoïde à 55 atomes de carbone), catalyse une suite coordonnée de réactions aboutissant à la synthèse d'un peptidoglycane « naissant » sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Ainsi que le montrent des études réalisées sur des protoplastes (cellules bactériennes dépourvues de paroi), le peptidoglycane naissant est formé de longues chaînes de glycane dont les substituants pentapeptidiques sont libres. Chez les bactéries normales, le peptidoglycane naissant, dès qu'il émerge de la membrane cytoplasmique, est attaché au peptidoglycane de la paroi préexistante grâce à l'intervention d'une transpeptidase : le groupement carboxyle de l'avant-dernier résidu D-alanine d'un pentapeptide donneur est transféré au groupement « aminé du résidu L-R₃ d'un peptide accepteur. Des liaisons interpeptidiques nouvelles sont ainsi formées sans apport d'énergie exogène et des quantités équivalentes de D-alanine sont libérées des peptides donneurs (Fig. 1).

Cette activité transpeptidasique n'est pas le seul constituant du système enzymatique impliqué dans la « fermeture des ponts interpeptidiques » lors de la synthèse du peptidoglycane pariétal. Le système comprend également une activité DD-carboxypeptidasique qui en hydrolysant les liaisons D-Ala-D-Ala C-terminales de certains pentapeptides (Fig. 1) limite le nombre de peptides donneurs disponibles et joue ainsi un rôle important dans la régulation de l'activité transpeptidasique. Les changements morphologiques qui surviennent continuellement durant le cycle vital d'une bactérie, la formation du septum, la division cellulaire dépendent, en parti-

culier, d'une modulation exacte des activités transpeptidasiques et DD-carboxypeptidasiques. En fait, la complexité du système varie énormément selon l'espèce bactérienne. Une même bactérie, *Escherichia coli* par exemple, contient plusieurs DD-carboxypeptidases et plusieurs transpeptidasés qui, probablement, sont impliquées spécifiquement dans divers événements cellulaires.

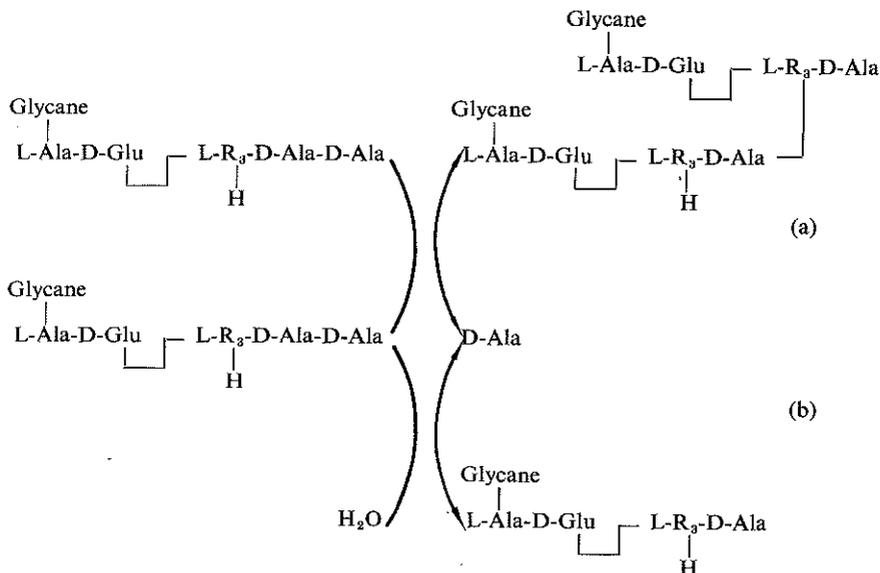


Figure 1. — Activité transpeptidasique (a) et DD-carboxypeptidasique (b).

Parmi tous les enzymes qui participent à la synthèse du peptidoglycane, seules les DD-carboxypeptidases et les transpeptidasés sont inhibées par les pénicillines et les céphalosporines. L'inhibition de l'ensemble du système DD-carboxypeptidase-transpeptidase bloque la croissance de la bactérie et, du moins chez les bactéries sauvages, déclenche une activité anarchique du système autolytique qui provoque la lyse de la cellule bactérienne. La sensibilité aux antibiotiques à noyau β -lactame des DD-carboxypeptidases et transpeptidasés varie considérablement non seulement selon la souche bactérienne, mais encore, chez une même souche, selon l'enzyme considéré. Il est possible que l'inhibition d'un seul de ces enzymes soit fatale à la bactérie; un tel enzyme représente, dès lors, la cible létale de l'antibiotique.

Le modèle d'étude.
(Ghuysen, 1976)

L'isolement des DD-carboxypeptidases et des transpeptidases posait un problème technique difficile qui consistait dans la mise au point d'un test permettant de les « voir » fonctionner alors qu'elles étaient retirées de la cellule, « découplées » de leurs substrats naturels. Il fallait donc inventer des systèmes artificiels de peptides donneurs et accepteurs qui, à cause de leur similitude avec les substrats naturels, pouvaient être reconnus et utilisés par les enzymes isolés. De tels systèmes ont été développés et ont été utilisés pour l'étude, à l'échelle moléculaire, des mécanismes de réaction d'hydrolyse (activité DD-carboxypeptidasique) et de transfert (activité transpeptidasique) ainsi que du mécanisme d'action de la pénicilline.

Diverses souches d'actinomycètes ont été choisies comme modèles d'étude pour les raisons suivantes. D'une part, leur système DD-carboxypeptidase-transpeptidase est relativement simple. Un premier enzyme, membranaire, fonctionne essentiellement comme transpeptidase et faiblement, comme DD-carboxypeptidase (Fig. 1). Un second enzyme, localisé plus superficiellement (associé à la paroi ou présent dans la région périplasmique) fonctionne essentiellement comme DD-carboxypeptidase et faiblement comme transpeptidase (Fig. 1) (résultats non publiés). Enfin, un troisième enzyme, similaire au deuxième et auquel il est apparenté antigéniquement (résultats non publiés), est exocellulaire. Excrété durant la croissance bactérienne, il s'accumule dans le milieu de culture.

Deux enzymes exocellulaires produits respectivement par *Streptomyces* R61 et *Actinomadura* R39 ont été purifiés jusqu'à homogénéité protéinique. L'un et l'autre sont constitués d'une seule chaîne polypeptidique de poids moléculaire relativement faible (38.000 et 53.000). Mis en présence d'un système approprié de peptides donneurs et accepteurs, ils catalysent à la fois une réaction d'hydrolyse (par exemple : $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala} + \text{D-Ala}$; activité DD-carboxypeptidasique) et une réaction de transfert (par exemple : $\text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-D-Ala} + \text{NH}_2\text{-R}$ (R = peptide) $\rightarrow \text{Ac}_2\text{-L-Lys-D-Ala-R} + \text{D-Ala}$). Selon les conditions expérimentales (polarité du milieu, pH, force ionique, concen-

tration en peptide accepteur), ces enzymes fonctionnent préférentiellement soit comme DD-carboxypeptidases ou, au contraire, comme transpeptidases. Les deux activités d'hydrolyse et de transfert d'un même enzyme présentent la même sensibilité aux pénicillines et céphalosporines; toutefois, l'enzyme exocellulaire de *Streptomyces* R61 est considérablement moins sensible que celui d'*Actinomadura* R39, ce qui offre la possibilité d'étudier le mécanisme par lequel des représentants de cette classe d'enzymes réagissent avec les antibiotiques à noyau β -lactame de façon parfois quantitativement différente.

Interaction entre pénicilline et DD-carboxypeptidases-transpeptidases.
(Ghuysen, 1976).

L'interaction entre la pénicilline et les DD-carboxypeptidases-transpeptidases exocellulaires de *Streptomyces* R61 et d'*Actinomadura* R39 est une réaction à étapes multiples : $E + P \xrightleftharpoons{K} EP \xrightarrow{k_3} EP^* \xrightarrow{k_4} E + X + Y$. Enzyme (E) et pénicilline (P) forment d'abord un complexe stœchiométrique EP; il s'agit d'une réaction à équilibre rapide caractérisé par une constante de dissociation (K). Ce complexe EP s'isomérisé ensuite en un second complexe EP* inactif dans lequel l'enzyme et l'antibiotique sont tous deux modifiés. Cette seconde étape se caractérise par une constante de réaction d'ordre 1 (k_3). Elle peut être très rapide et se dérouler à une « vitesse enzymatique ». Ainsi, par exemple, la valeur de k_3 pour l'interaction entre la pénicilline G et l'enzyme de *Streptomyces* R61 est de 180 s^{-1} . Dans ce cas particulier, la pénicilline G est dans le complexe EP*, fixée sur un résidu de sérine de l'enzyme (Frère *et al.*, 1976). Enfin, dans une troisième étape, le complexe EP* se décompose spontanément en régénérant un enzyme actif et en libérant l'antibiotique sous forme de fragments biologiquement inactifs (X et Y). La pénicilline G est scindée en phénylacétylglycine et N-formyl-D-pénicillamine. Une telle scission nécessite non seulement l'hydrolyse de la fonction amide du β -lactame mais aussi la rupture d'une liaison carbone-carbone entre le C₅ et le C₆ de la molécule. Cette troisième étape est toujours lente; elle se caractérise par une constante de réaction d'ordre 1 (k_4).

Les antibiotiques à noyau β -lactame sont donc, en fait, des substrats des DD-carboxypeptidases-transpeptidases exocellulaires. Cependant, ils se comportent comme des inhibiteurs de ces enzymes dans la mesure où ils immobilisent ces derniers sous forme de complexes EP* enzymatiquement inactifs. Un antibiotique est donc un inhibiteur d'autant plus puissant que la valeur de la constante de dissociation K est faible, que la vitesse d'isomérisation k_3 est grande (c'est-à-dire que le rapport k_3/K est grand) et que la vitesse de décomposition k_4 est faible.

La validité du mécanisme proposé a été vérifiée en démontrant qu'une relation existe effectivement, pour toute une série de pénicillines, entre les concentrations minimales requises pour inhiber la croissance de *Streptococcus faecalis* et les valeurs des constantes impliquées dans les interactions entre ces mêmes antibiotiques et une DD-carboxypeptidase membranaire (à faible activité transpeptidasique) de la bactérie. Au cours de cette réaction, la pénicilline G est également scindée en phénylacétylglycine et N-formyl-D-pénicillamine (Coyette *et al.*, 1977). Dans le cas de *Streptomyces* R61, la cible létale des antibiotiques à noyau β -lactame est la transpeptidase membranaire (à faible activité DD-carboxypeptidasique). Dans ce cas, cependant, seule la liaison amide du noyau β -lactame est hydrolysée et le produit de dégradation est l'acide pénicilloïque (résultats non publiés). Ainsi, les DD-carboxypeptidases-transpeptidases peuvent se comporter comme des pénicillinases à activité catalytique lente! Le mécanisme de ces réactions est à l'étude. Il est possible que le sort de la molécule d'antibiotique dépende de la conformation de l'enzyme au sein des complexes EP*.

CONCLUSIONS

Le fait que la cible bactérienne dégrade l'antibiotique utilisé dans le but de l'inactiver, éclaire d'une façon nouvelle l'important problème de la résistance bactérienne aux pénicillines et aux céphalosporines. Un mécanisme de résistance bactérienne n'impliquant pas l'intervention de pénicillinases classiques pourrait résulter de modifications mineures de la structure des DD-carboxypeptidases-transpeptidases. Ces modifications n'affecteraient pas les propriétés catalytiques de ces enzymes pour leurs substrats

pariétaux mais auraient pour effet de modifier une ou plusieurs des constantes K , k_3 et k_4 de sorte que l'affinité pour l'antibiotique serait considérablement diminuée ou, au contraire, que la vitesse de dégradation de celui-ci serait considérablement augmentée. Il est intéressant de noter qu'un nombre croissant de rapports apparaissent dans la littérature qui décrivent des cas de résistance aux pénicillines en l'absence, apparemment, de production de pénicillinase classique.

L'objectif final de ces études est d'exprimer en termes quantitatifs de constantes de vitesse de réaction les relations qui doivent exister entre la structure des antibiotiques à noyau β -lactame et leur activité antibactérienne. Il n'est pas impossible que ces études, si elles peuvent être menées à bonne fin, n'ouvrent la voie à une recherche rationnelle d'agents antibactériens nouveaux.

RÉSUMÉ

Les antibiotiques à noyau β -lactame sont à la fois des substrats et des inhibiteurs du système DD-carboxypeptidase-transpeptidase impliqué dans la fermeture des ponts interpeptidiques lors de la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries.

SUMMARY

The β -lactam antibiotics are both substrates and inhibitors of the DD-carboxypeptidase-transpeptidase enzyme system involved in the closure of the interpeptide bridges during the biosynthesis of the wall peptidoglycan in bacteria.

BIBLIOGRAPHIE

- COYETTE, J., J.M. GHUYSEN, F. BINOT, P. ADRIAENS, B. MEE-SCHAERT et H. VANDERHAEGHE. *Eur. J. Biochem.* (1977), sous presse.
- FRÈRE, J.M., C. DUEZ, J.M. GHUYSEN, J. VANDEKERKHOVE. *FEBS Letters*, 70 : 257 (1976).

- GHUYSEN, J.M. *Bact. Rev.*, 32 : 425 (1968).
- GHUYSEN, J.M. et G.D. SHOCKMAN. In : *Bacterial Membranes and Walls*. Ed. L. Leive, New York, Dekker Inc., p. 37 (1973).
- GHUYSEN, J.M. *The Bacterial DD-Carboxypeptidase-Transpeptidase Enzyme System : A New Insight Into the Mode of Action of Penicillin*. (E.R. Squibb Lectures on Chemistry of Microbial Products), University of Tokyo Press (1976).
- SCHLEIFER, K.H. et O. KANDLER. *Bact. Rev.*, 36 : 407 (1972).

(Service de Microbiologie appliquée aux Sciences pharmaceutiques,
Institut de Botanique, Université de l'Etat à Liège.)

*
**

M. le Président exprime à M. Ghuyesen la gratitude de l'assemblée pour son intéressante communication.

Discussion

M. J. Beumer. — En conclusion du remarquable exposé que vous venez de faire, vous proposez un nouveau type de résistance aux pénicillines : une modification de la cible de ces pénicillines, c'est-à-dire l'enzyme de transpeptidation. Ne peut-on aussi envisager des mutants résistants chez qui il y a élaboration d'autres enzymes, qui ne seraient pas des substrats des pénicillines ou, d'autre part, des mutants chez qui la structure du peptidoglycane serait différente ?

M. J.M. Ghuyesen. — La réaction de transpeptidation implique toujours la participation d'un peptide donneur se terminant par la séquence D-Ala-D-Ala. Toutefois, la nature du groupement aminé accepteur varie parfois selon la structure du peptidoglycane pariétal. L'apparition d'un mutant chez qui la structure du peptidoglycane serait différente quant à la nature de la liaison interpepti-

dique impliquerait l'apparition chez ce mutant, d'une transpeptidase différente de celle de la souche sauvage. Cette transpeptidase modifiée pourrait avoir une sensibilité à la pénicilline également modifiée. Des mutants peuvent aussi apparaître, dont les transpeptidases ont une résistance à la pénicilline fortement accrue sans que la structure du peptidoglycane soit altérée.

*
**

Comité secret

— Les I^e, II^e, III^e, IV^e et VI^e Sections communiquent la liste de leurs candidats en vue des élections du premier semestre.

*
**