

## Mort bactérienne et antibiotiques de la famille des $\beta$ -lactamines

Le mécanisme d'action des  $\beta$ -lactamines est fondé sur la liaison de l'antibiotique aux enzymes participant à la synthèse de la paroi bactérienne, les PLP (protéines liant la pénicilline) encore appelées PBP (*penicillin binding proteins*). La conséquence de cette interaction moléculaire est l'inhibition de la biosynthèse et du remodelage du peptidoglycane, le constituant principal de la paroi bactérienne. Cet effet bactériostatique des  $\beta$ -lactamines est dû principalement à l'inhibition des fonctions de transpeptidation. Quant à l'activité bactéricide des pénicillines, on supposait qu'elle résultait de la rupture, sous l'effet de la pression osmotique, de la paroi cellulaire fragilisée. Il est maintenant évident que la réalité est différente et beaucoup plus complexe.

Le peptidoglycane forme un réseau covalent fermé qui stabilise la bactérie dans une sorte de cytosquelette. La persistance de ce réseau requiert la présence de muréine-hydrolases, enzymes capables de cliver la paroi au cours de la croissance bactérienne et de la séparation cellulaire. Les hydrolases peuvent aussi agir comme des autolysines, dissolvant entièrement la paroi de la bactérie et jouant alors le rôle d'enzymes suicides [1]. Cette dichotomie dans la fonction de l'enzyme entraînant la vie ou la mort souligne la nécessité d'une régulation stricte et efficace de l'activité hydrolytique, un paradigme conceptuellement similaire à celui des caspases dans le processus de l'apoptose chez les eucaryotes. L'expression de la plu-

part des autolysines est constitutive et persiste tout au long du cycle cellulaire, et les enzymes sont continuellement présentes sur la surface bactérienne. Elles ne deviennent en revanche physiologiquement actives que lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire de croissance. L'autolyse due à l'activation des autolysines, l'une des principales étant LytA, est caractéristique des pneumocoques. Certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* ont cependant perdu la fonction hydrolase LytA, et l'addition de pénicilline à des cultures de ces bactéries provoque un arrêt de la croissance bactérienne mais n'entraîne pas la lyse ou la mort cellulaire. Ce phénomène, décrit pour la première fois en 1970, est appelé tolérance aux antibiotiques [1, 2].

Ainsi, la liaison des  $\beta$ -lactamines aux PLP et l'arrêt de la croissance bactérienne qu'elle entraîne ne suffisent pas à engendrer la mort cellulaire. Ces données ont conduit à repenser le modèle d'action bactéricide des pénicillines. Pour qu'il y ait mort cellulaire, il faut une coopération active des bactéries qui utilisent alors leur propre machinerie enzymatique suicide [3, 4]. Bien que fondamental à l'action des pénicillines, le mécanisme par lequel l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire ou la liaison des pénicillines aux PLP conduit seul à l'activation de la machinerie autolytique reste à ce jour inexpliqué.

La tolérance aux antibiotiques est rencontrée chez plus de 15 % des souches cliniques de pneumocoques.

Dans ce cas, la liaison à l'antibiotique est déconnectée du mécanisme de la mort cellulaire. Ce phénotype semble être le résultat de mutations génétiques qui affectent non pas directement les autolysines, mais plutôt la régulation de leur activité [5]. Afin de définir les éléments qui contrôlent le déclenchement de l'autolyse chez le pneumocoque, une banque de mutants a été créée et criblée sur le critère de la perte d'autolyse induite par la pénicilline [6]. Il a ainsi été possible d'identifier dix-sept mutants indépendants qui possédaient une autolysine LytA active, mais dont la mort n'était pas déclenchée en présence de pénicilline. Un de ces mutants était également tolérant à la vancomycine. Le gène interrompu de ce mutant code pour une kinase à histidine, VncS, un capteur membranaire d'un système de régulation à deux composants (*m/s* 1999, n°10, p. 1177). Ces systèmes sont très fréquents chez les bactéries et associent une protéine-kinase/phosphatase (*sensor*) qui réagit aux signaux extérieurs par transphosphorylation, et une protéine régulatrice activée ou inhibée par la précédente. L'analyse génétique du locus *vncS* a permis de révéler la présence contiguë d'un gène codant pour un régulateur transcriptionnel, VncR. La structure primaire des protéines VncS et VncR présente 38 % d'identité avec celle de VanS<sub>B</sub> et VanR<sub>B</sub>, système de régulation à deux composants impliqué dans la résistance aux glycopeptides chez *Enterococcus faecalis* [7, 8]. L'addition d'une concentration équi-

valente à dix fois la concentration minimale inhibitrice (CMI, 5 µg/ml) de pénicilline à un mutant invalidé pour le gène *vncS* provoquait l'arrêt de la croissance bactérienne mais ne conduisait pas à une perte de viabilité. Les CMI de la pénicilline et de la vancomycine étaient respectivement de 0,01 et de 0,5 µg/ml, permettant de démontrer que l'accès des antibiotiques à leurs cibles membranaires était inchangé chez ce mutant. Si les bactéries devenaient tolérantes lorsque la kinase VncS de ce système était inactivée, elles restaient cepen-

dant sensibles lorsque le régulateur transcriptionnel VncR était rendu non fonctionnel par mutation de son gène [6, 9]. L'analyse des locus génétiques adjacents au système VncS-VncR a permis d'identifier la présence, en amont du gène *vncS*, de trois gènes codant pour un transporteur de type ABC, Vex, et d'une courte phase de lecture ouverte codant pour un peptide de 27 acides aminés, Pep<sup>27</sup> [10]. Ce peptide est synthétisé par la bactérie et exporté par le transporteur ABC Vex. Pep<sup>27</sup> fonctionnerait comme un

signal nécessaire au déclenchement des voies de la mort cellulaire chez le pneumocoque. Pep<sup>27</sup> est en effet capable d'arrêter la croissance et d'induire la mort non seulement chez des souches sauvages de pneumocoque mais aussi chez des souches dont l'autolysine LytA n'est pas fonctionnelle. Il apparaît donc que le système à deux composants VncS-VncR pourrait ainsi contrôler une ou plusieurs voies de signalisation conduisant à la mort bactérienne autres que celle qui conduit à l'activation de l'autolysine LytA [9, 10].

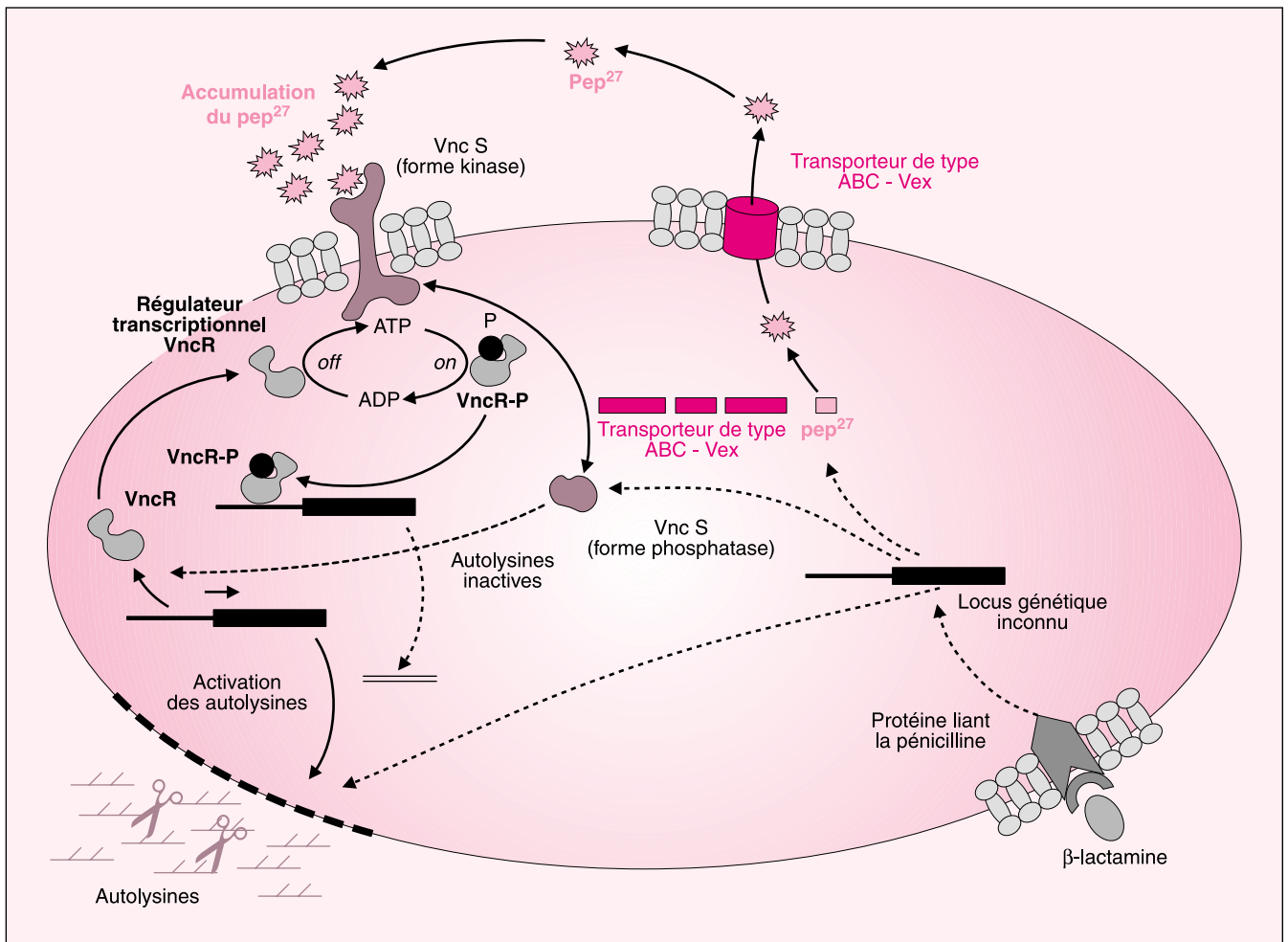


Figure 1. **Modèle de déclenchement de l'activité de l'autolysine.** En réponse aux antibiotiques ou lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire de croissance, des signaux de l'environnement sont déclenchés et règlent l'addition d'un groupe phosphate (P) au capteur membranaire VncS qui peut jouer le rôle de kinase ou de phosphatase. En réponse, le régulateur transcriptionnel VncR est sous une forme active phosphorylée (on) ou inactive déphosphorylée (off). Sous sa forme active, VncR réprime l'expression des gènes responsables de l'activation de l'autolysine et de la mort cellulaire. Le peptide Pep<sup>27</sup> a été identifié comme un signal de densité cellulaire qui déclenche la mort bactérienne. Il est exporté par le transporteur Vex de type ABC, accumulé dans le compartiment extracellulaire et capté par le système de régulation à deux composants VncS-VncR, contrôlant ainsi les voies de la mort de la cellule.

Ces résultats nous ont permis de proposer un modèle qui intègre la biologie du peptide Pep<sup>27</sup> et la voie de transduction du signal induite par le système de régulation à deux composants VncS-VncR [10] (figure 1). Au cours de la phase logarithmique de croissance des bactéries, le régulateur transcriptionnel VncR serait sous forme phosphorylée, il se lierait à l'ADN chromosomique et réprimerait les systèmes autolytiques et autres systèmes de la mort cellulaire. Dans ces conditions, le gène *pep*<sup>27</sup> est transcrit de façon constitutive à bas niveau, et le peptide Pep<sup>27</sup> est exporté hors de la cellule par le transporteur Vex, provoquant ainsi son accumulation progressive dans le compartiment extracellulaire. Au cours de la phase stationnaire de croissance, pendant laquelle l'autolyse survient, la concentration extracellulaire de Pep<sup>27</sup> atteindrait un plateau critique permettant sa capture par le capteur membranaire VncS. VncS fonctionnerait alors comme une phosphatase conduisant à la déphosphorylation du régulateur transcriptionnel VncR. VncR, sous sa forme déphosphorylée, se détacherait de son (ses) site(s) sur le chromosome, provoquant ainsi un

changement dans la transcription de(s) gène(s) cible(s), et déclenchant finalement l'événement autolytique. Ces nouvelles données permettent de démontrer clairement que les effets bactéricides des  $\beta$ -lactamines sont dus à la voie de signalisation déclenchée par le système de régulation à deux composants VncS-VncR. Le mécanisme connectant l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne par les antibiotiques et la voie du peptide de la mort bactérienne reste à élucider.

1. Tomasz A, Albino A, Zanati E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 1970; 227: 138-40.
2. Horne D, Tomasz A. Tolerant response of *Streptococcus sanguis* to beta-lactams and other cell wall inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 11: 888-96.
3. Tomasz A, Holtje JV. Murein hydrolases and the lytic and killing action of penicillin. In: Schlesinger D, Washington DC, ed: *Microbiology*. (American Society for Microbiology) 1977: 209-15.
4. Tomasz A. From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 434-67.
5. Novak R, Tuomanen E. Phenotypic tolerance. In: Lewis S, Taber, Wax, eds. *Bacterial resistance to antimicrobials: mechanisms, genetics, medical practice and public health* (New York: Marcel Dekker, Inc.) 2000.
6. Novak R, Henriques B, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. Emergence of vancomycin

tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1999; 399: 590-3.

7. Evers S, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS<sub>B</sub>-VanR<sub>B</sub> two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 1996; 178: 1302-9.

8. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 1996; 4: 401-7.

9. Gilmore MS, Hoch JA. Antibiotic resistance. A vancomycin surprise. *Nature* 1999; 399: 524-5, 527.

10. Novak R, Charpentier E, Braun JS, Tuomanen E. Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell* 2000; 5: 49-57.

#### Remerciements

Nous remercions vivement les Drs Marie-Cécile Ploy et Jacques Tankovic pour leurs commentaires sur ce manuscrit.

#### Emmanuelle Charpentier Rodger Novak

*Department of Molecular Pathogenesis,  
Skirball Institute of Biomolecular Medi-  
cine, NYU Medical Center, New York,  
NY 10016, États-Unis.*