

Résistance bactérienne aux β -lactamines

Paulette Charlier
Jacques Coyette
Dominique Dehareng
Georges Dive
Colette Duez
Jean Dusart
Éveline Fonzé
Claudine Fraipont
Jean-Marie Frère
Moreno Galleni
Colette Goffin
Bernard Joris
Josette
Lamotte-Brasseur
Martine
Nguyen-Distèche

Dans l'arsenal de la chimiothérapie antibactérienne, les antibiotiques de la famille de la pénicilline ou β -lactamines sont les plus largement utilisés, en raison de leur activité élevée et de leur absence presque totale d'effets secondaires. Les bactéries ont cependant développé des mécanismes de résistance efficaces reposant sur différents facteurs génétiquement indépendants : une diminution de la sensibilité des cibles, des DD-peptidases ancrées à la face externe de la membrane cytoplasmique, la production d'enzymes qui catalysent la destruction de l'antibiotique et, chez les bactéries à Gram⁻ et les mycobactéries, la présence d'une barrière de perméabilité qui ralentit la diffusion de l'antibiotique vers ses cibles. Des mécanismes actifs d'expulsion de l'antibiotique peuvent aussi se rencontrer. Les diverses stratégies imaginées pour contrer cette résistance entraînent des réponses bactériennes d'une remarquable diversité. Une lutte rationnelle contre les espèces pathogènes demande une compréhension de ces phénomènes qui intègre la microbiologie, la génétique moléculaire, l'enzymologie, l'analyse structurale des protéines impliquées et l'étude des réactions qu'elles catalysent par les méthodes de la chimie théorique.

ADRESSES

P. Charlier : *chef de travaux*. J. Coyette : *chargé de cours*. D. Dehareng : *premier assistant patrimoine*. G. Dive : *chercheur qualifié du FNRS*. C. Duez : *chercheur qualifié du FNRS*. J. Dusart : *chercheur qualifié du FNRS*. E. Fonzé : *premier assistant patrimoine*. C. Fraipont : *premier assistant patrimoine*. J.M. Frère : *professeur ordinaire*. M. Galleni : *premier assistant patrimoine*. C. Goffin : *chercheur qualifié du FNRS*. B. Joris : *chercheur qualifié du FNRS*. J. Lamotte-Brasseur : *chef de travaux*. M. Nguyen-Distèche : *chef de travaux*. Centre d'ingénierie des protéines, Université de Liège, Institut de Chimie, B6, B-4000 Liège, Belgique.

Hormis quelques exceptions, les bactéries sont entourées d'une paroi formée d'une ou de plusieurs enveloppes différentes.

L'une d'elles est formée par un peptidoglycane, le principal constituant de la paroi des bactéries à Gram⁺ et un composé minoritaire de celle des bactéries à Gram⁻. Il protège l'organisme contre la pression osmotique interne et détermine également sa morphologie.

La synthèse du peptidoglycane et les transpeptidases sensibles à la pénicilline

La biosynthèse du peptidoglycane comporte un nombre important d'étapes qui conduisent à la formation, dans le cytoplasme, de deux précurseurs nucléotidiques. Ces précurseurs sont ensuite assemblés sur un transporteur lipidique (lipide II) et transférés à la face externe de la mem-

brane cytoplasmique sous la forme d'un disaccharide peptide du type N-acétylglucosaminyl(β -1,4)acide-N-acétylmuramique substitué par un oligopeptide comprenant 5 à 10 acides aminés [1].

Cette biosynthèse se termine par deux étapes cruciales pour la construction d'un polymère réticulé insoluble. La première fait intervenir une transglycosylase qui juxtapose et unit les disaccharides peptides pour former des chaînes de glycane. La

seconde réaction crée une liaison covalente entre peptides portés par des chaînes de glycane voisines. Elle conduit donc à la formation de ponts interpeptidiques assurant la réticulation du peptidoglycane (figure 1). La réaction est catalysée par des DD-transpeptidases qui coupent la liaison peptidique D-Ala-D-Ala carboxy-terminale des oligopeptides portés par les chaînes de glycane, libérant ainsi la dernière D-alanine, puis transfèrent le groupement CO de l'avant-

dernière D-alanine sur le groupement aminé libre d'un oligopeptide porté par une autre chaîne glucosidique. Les β -lactamines (figure 2) inhibent cette réaction complexe de transpeptidation en se fixant de manière covalente au site actif des DD-transpeptidases si bien que l'on désigne très souvent ces enzymes comme des protéines liant la pénicilline ou *penicillin-binding proteins* (PBP).

Les PBP sont des protéines localisées sur la face externe de la membrane cytoplasmique et généralement fixées par un peptide terminal transmembranaire ou amphiphile. Les PBP varient en nombre (quatre chez *Neisseria*, neuf chez *Escherichia coli*) et en taille (de 35 à 120 kDa) selon les bactéries. Enfin, dans un organisme déterminé, ces protéines présentent des affinités différentes pour une même β -lactamine.

Les PBP sont réparties en deux grands groupes: les protéines indispensables à la survie des cellules, de taille supérieure à 60 kDa, et d'autres, plus petites, qui paraissent accessoires. Les PBP du premier groupe sont formées de deux modules assurant des fonctions différentes. Leur module carboxy-terminal présente trois motifs bien conservés, caractéristiques des protéines reconnaissant la pénicilline et a ou devrait avoir une activité transpeptidase (on n'arrive pas toujours à mettre cette dernière en évidence *in vitro*). On distingue, en revanche, deux types de modules amino-terminaux caractérisés par une activité et des motifs conservés différents. Cela permet une subdivision des PBP de grande taille en deux sous-groupes A et B [2]. Pour certaines protéines du sous-groupe A, comme les PBP1a et 1b d'*E. coli*, on a démontré l'activité transglycosylasique du module amino-terminal. Ces protéines bifonctionnelles interviendraient dans la synthèse de base du peptidoglycane et pourraient se compléter mutuellement. Il faut en effet inhiber simultanément les PBP1a et 1b par une β -lactamine spécifique pour induire un phénomène lytique et la mort des cellules.

Le module amino-terminal des PBP du sous-groupe B n'a pas d'activité enzymatique connue. Ces protéines jouent toutefois des rôles spécifiques

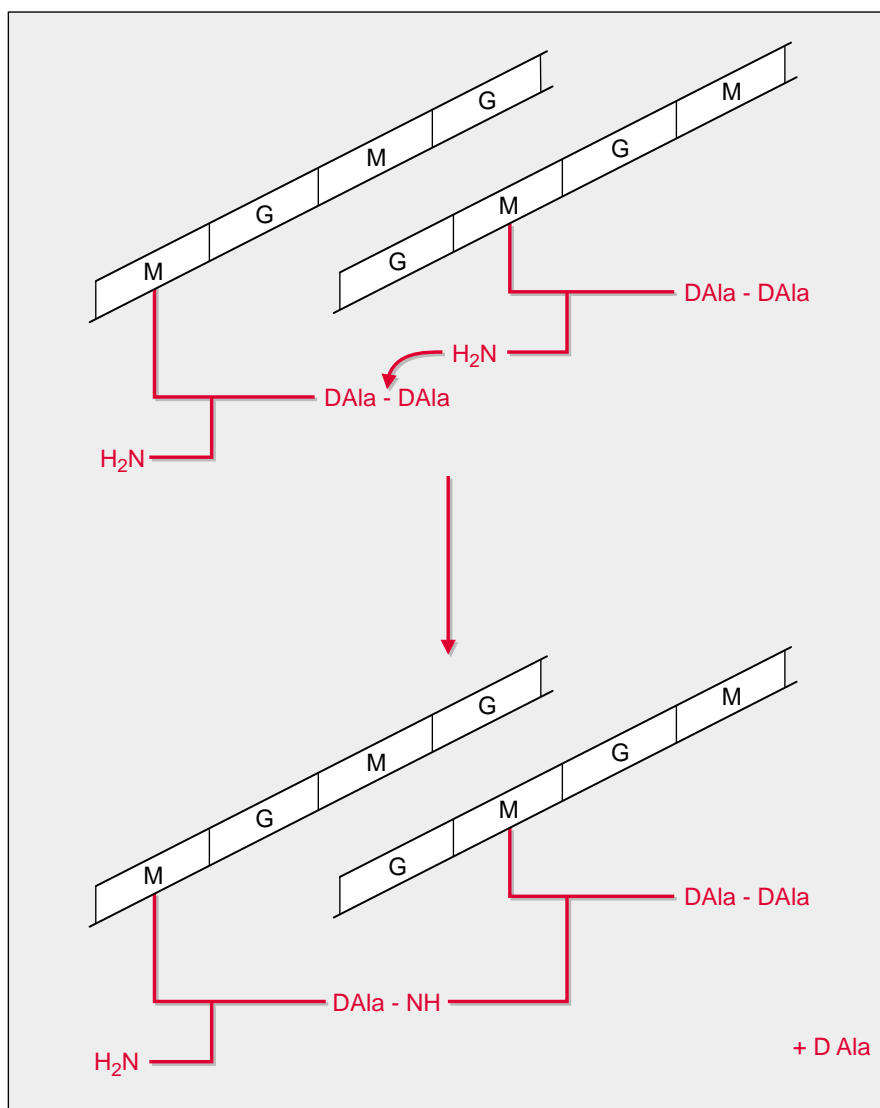


Figure 1. **Fermeture des ponts peptidiques du peptidoglycane.** Les chaînes saccharidiques sont en noir (G : N-acétylglucosamine ; M : acide N-acétylmuramique) et la partie peptidique en rouge. La partie saccharidique est synthétisée par ajout des unités disaccharide-peptide liées au transporteur lipidique. La réaction de transpeptidation décrite ci-dessus est catalysée par une DD-peptidase habituellement sensible à la pénicilline. Elle a pour résultat la formation de ponts peptidiques entre les chaînes saccharidiques, ce qui assure la résistance mécanique du polymère.

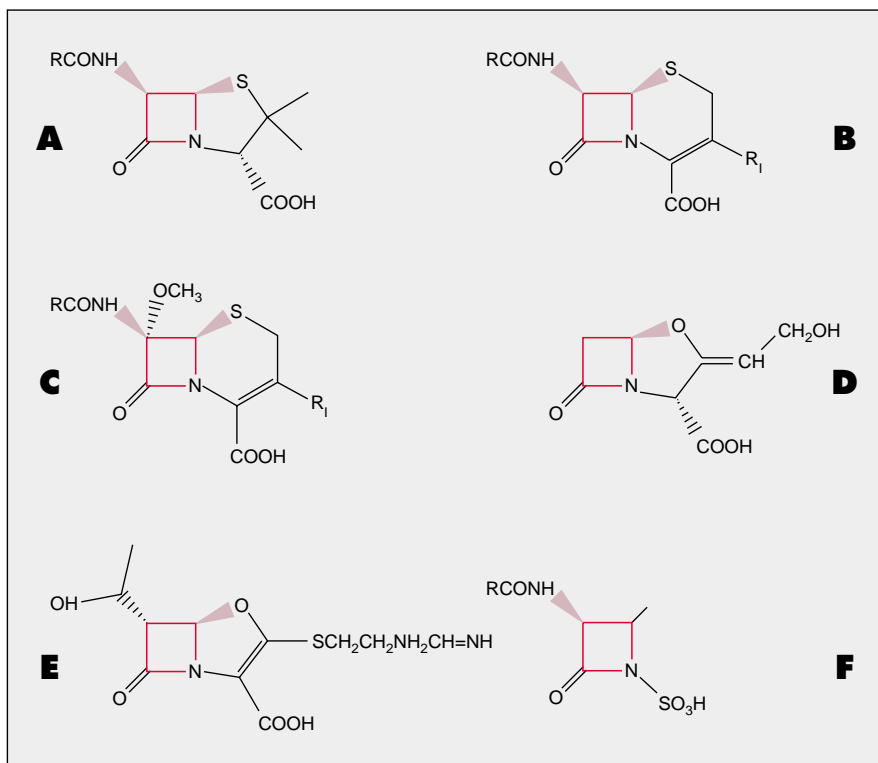


Figure 2. **Structures de quelques β -lactamines.** A: pénicillines; B: céphalosporines; C: céphamycines; D: acide clavulanique; E: imipénème (carbapénème); F: monobactames.

dans la morphogenèse de la cellule en association étroite avec une ou plusieurs autres protéines membranaires. C'est le cas, par exemple, de la PBP2 d'*E. coli* qui assure le maintien de la forme cylindrique des cellules. Son inhibition spécifique ou son absence provoque l'apparition de cellules sphériques. La PBP3 d'*E. coli* intervient dans la division cellulaire en assurant la synthèse du septum. L'inhibition spécifique par une β -lactamine ou l'absence de cette protéine transforme les cellules en filaments non cloisonnés. La PBP3 est un élément constitutif d'un complexe multiprotéique parfois appelé divisome [3].

Les PBP accessoires sont des protéines monofonctionnelles dont la structure est similaire à celle du domaine carboxy-terminal des PBP de grande taille. Elles agissent comme des DD-carboxypeptidases et, plus rarement, des DD-transpeptidases. L'absence ou l'inhibition spécifique de ces protéines n'affecte en rien la viabilité des cellules mais peut modifier le degré de polymérisation

du peptidoglycane ou la sensibilité des cellules aux β -lactamines. Ces protéines possèdent trois motifs peptidiques très conservés analogues à ceux qui ont été identifiés dans le module carboxy-terminal des PBP de masse moléculaire élevée. Ces motifs ont été localisés au niveau du site actif des enzymes dont la structure tridimensionnelle a été établie. Le premier d'entre eux contient toujours la sérine sur laquelle se fixent de façon covalente les β -lactamines et les substrats naturels ou synthétiques terminés par le dipeptide D-Ala-D-Ala.

Il est important de noter que la structure du peptidoglycane synthétisé grâce aux PBP n'est pas statique mais au contraire dynamique. Elle subit en effet des remaniements constants qui impliquent la coupure contrôlée de certaines liaisons par des enzymes hydrolytiques, appelées généralement autolysines. Ces coupures entraînent la libération de dérivés du peptidoglycane et permettent l'insertion de matériaux nouvellement synthétisés assurant, par exemple, l'expansion de la paroi au cours du cycle cellulaire [4].

Les mécanismes de résistance

Les PBP de faible affinité

Ces enzymes se répartissent en deux types: d'une part, des protéines multifonctionnelles capables de remplacer les PBP essentiels inhibés par les β -lactamines et, d'autre part, des protéines dérivées de PBP normaux et déterminées par des gènes en mosaïque.

Les protéines multifonctionnelles participent à la résistance de quelques bactéries à Gram⁺ très voisines: les staphylocoques résistant à la méthicilline (essentiellement: *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*) et les entérocoques qui ont une résistance naturelle aux β -lactamines supérieure à celle des autres bactéries à Gram⁺ pathogènes.

Les staphylocoques résistants et sensibles se distinguent par la présence chez les premiers d'une protéine supplémentaire de faible affinité, PBP2' ou 2a, codée par le gène *mecA*. Ce gène aurait pour origine un gène homologue de celui de *Staphylococcus sciuri* qui pourrait avoir une fonction physiologique normale et n'exercer aucun rôle dans la résistance aux β -lactamines. Pour être parfaitement exprimée, la résistance implique le bon fonctionnement de gènes auxiliaires, comme les gènes *fem*, intervenant dans la biosynthèse du peptidoglycane. Selon les souches, la résistance est constitutive ou inducible. Dans le second cas, l'expression du gène *mecA* est soumise à une régulation transcriptionnelle par les gènes *mecR* et *mecI* qui ont une action comparable aux gènes régulateurs *blaR* et *blaI* de la β -lactamase de *S. aureus* et de *Bacillus licheniformis* (voir plus loin) [5, 6].

La résistance relative des entérocoques aux β -lactamines est due à un PBP de faible affinité dont l'origine est encore inconnue. Quoiqu'il soit généralement peu abondant dans la membrane cytoplasmique, sa présence suffit à modifier le phénotype des cellules. En effet, une inactivation ciblée du gène déterminant ce PBP augmente nettement la sensibilité des mutants d'*Enterococcus faecium* et d'*E. hirae*. Dans ces deux espèces, la synthèse du PBP de faible affinité (PBP5) est partiellement réprimée par un régulateur dont le gène, *psr*,

est situé immédiatement en amont du gène du PBP5. L'inactivation du gène *psr* ou le non-fonctionnement de son produit entraîne une surproduction du PBP5, ce qui provoque un accroissement de la résistance, à un niveau intermédiaire, dans certaines souches cliniques et de laboratoire des deux espèces. La très grande résistance de certaines souches cliniques est principalement due à une réduction de l'affinité pour les β -lactamines à la suite de la substitution de quelques acides aminés du domaine carboxy-terminal du PBP5 [7].

Les gènes en mosaïque dirigent la synthèse de PBP dont l'affinité est réduite et sont responsables d'une résistance aux β -lactamines chez plusieurs bactéries différentes: *Streptococcus pneumoniae*, streptocoques du groupe *viridans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*. Ces gènes ont été surtout étudiés chez le pneumocoque, le méningocoque et le gonocoque qui, comme les autres bactéries citées ci-dessus, sont susceptibles de subir une transformation naturelle. Ils sont le produit de phénomènes de recombinaison interspécifique permettant l'échange de fragments d'un gène de PBP normal avec des fragments analogues provenant d'un gène allèle d'espèces résistantes apparentées dans la flore avoisinante, par exemple la flore oropharyngée. La reproduction *in vitro* des mutations portées par les gènes en mosaïque

ponA (PBP1) et *penA* (PBP2) du gonocoque ne provoque qu'un faible accroissement de la résistance lorsqu'un seul gène est concerné. En revanche, si les recombinaisons impliquent les deux gènes simultanément, la résistance augmente d'un facteur 1000 et est proche de celle des souches cliniques. Les bactéries donneuses des fragments recombinants sont *Neisseria flavescens* et *Neisseria cinerea*, deux espèces non pathogènes mais très résistantes aux β -lactamines. Dans les souches cliniques les plus résistantes, outre la présence des gènes en mosaïque, on note une réduction de la perméabilité de la membrane externe aux β -lactamines [8].

Trois PBP (PBP1a, 2x et 2b) sur les cinq que compte le pneumocoque sont le produit de gènes en mosaïque et participent à la résistance de haut niveau mesurée dans certaines souches cliniques. L'origine des fragments recombinés est difficile à établir mais elle se trouve vraisemblablement chez les streptocoques du groupe *viridans*. Comme pour le gonocoque et le méningocoque, les expériences menées en laboratoire démontrent qu'un seul PBP de « faible affinité » obtenu par recombinaison génétique est insuffisant pour élever la résistance à son plus haut niveau. Au moins deux sinon trois PBP de « faible affinité » sont requis simultanément pour augmenter la résistance d'un facteur 1000.

Les pneumocoques résistants aux β -lactamines possèdent un peptidoglycane dont la structure chimique est modifiée par rapport aux souches sensibles. Cette modification est attribuée à la spécificité des PBP dérivés des gènes en mosaïque. Les modifications chimiques du peptidoglycane constatées chez les staphylocoques et les entérocoques résistants ne sont pas le fait des PBP de faible affinité mais résultent de l'activité ou de l'inactivité de gènes auxiliaires responsables de la synthèse de protéines différentes des PBP.

Les β -lactamases

Les β -lactamases hydrolysent le cycle β -lactame (figure 3), inactivant ainsi l'antibiotique. Ces enzymes sont sécrétées dans le milieu de culture ou dans le périplasma respectivement par les bactéries à Gram⁺ ou Gram⁻. De rares cas de liaison à la membrane cytoplasmique ont été signalés et, chez les mycobactéries, on retrouve une forte proportion d'enzyme dans la couche d'acides mycoliques. Les gènes peuvent être portés par le chromosome ou des plasmides, parfois par des transposons ou des intégrons. La présence des gènes sur ces éléments génétiques transférables (plasmides, transposons, intégrons) facilite évidemment leur dispersion dans le monde bactérien. L'expression des gènes est constitutive ou inducible [9].

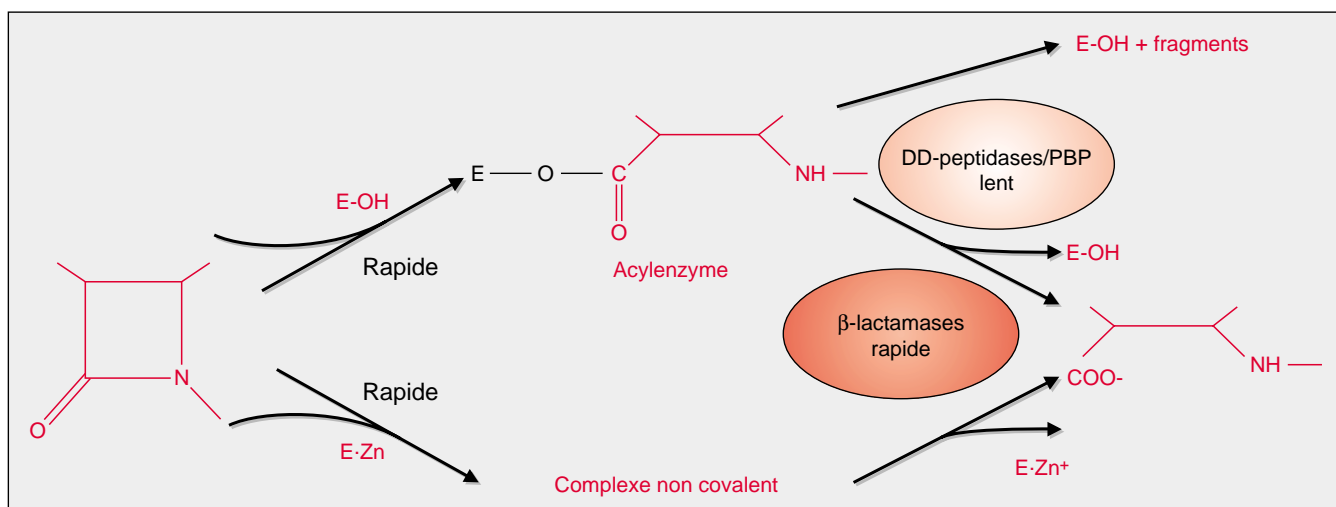


Figure 3. **Ouverture du noyau β -lactame par les DD-peptidases (E-OH) et les β -lactamases (E-OH ou E-Zn).** Dans le cas des enzymes à sérine, la vitesse d'hydrolyse de l'acylenzyme détermine le type de phénomène: inactivation de l'enzyme (PBP) ou hydrolyse rapide de la β -lactamine (β -lactamases).

Plus de deux cents β -lactamases différentes ont été identifiées [10]. Sur la base du mécanisme catalytique, on distingue les enzymes à sérine active réparties, selon leurs structures primaires, dans les classes A, C et D et les enzymes à Zn^{2+} qui forment la classe B. Le profil de spécificité varie selon l'enzyme. Ainsi, les enzymes de classe B, qui furent longtemps considérées comme une curiosité biochimique, se sont révélées capables d'hydrolyser l'imipénème, une molécule qui échappait à l'action de la quasi-totalité des enzymes à sérine. Une de ces métallo-protéines, la β -lactamase plasmidique IMP-1, a été détectée avec une fréquence inquiétante dans des pays comme le Japon, où ce carbapénème était largement utilisé.

Perméabilité

Les bactéries à Gram⁻ possèdent à l'extérieur du peptidoglycane une structure supplémentaire, la membrane externe. Cette membrane forme une barrière physique et fonctionnelle entre la cellule et son environnement. Elle ralentit la diffusion des antibiotiques et autres agents toxiques vers leurs cibles.

La membrane externe est formée d'une couche interne de phospholipides et d'une couche externe de lipopolysaccharides comprenant le lipide A (partie hydrophobe) et une partie hydrophile polysaccharidique. Si elle permet le passage des substances lipophiles de taille réduite, la nature hydrophobe de cette membrane externe empêche celui des substances hydrophiles.

Des protéines, les porines, forment des canaux dans la membrane externe par lesquels diffusent, de manière non spécifique, les solutés de petite taille y compris les substances nutritives. Ainsi, *E. coli* possède deux porines non spécifiques (OmpF et OmpC) et plusieurs porines spécifiques généralement présentes dans certaines conditions physiologiques (PhoE pour les ions phosphate, LamB pour le maltose et la maltodextrine). *Pseudomonas aeruginosa* a des porines qui remplissent les mêmes fonctions ainsi qu'une porine OprD2 spécifique des acides aminés basiques (lysine et arginine). De manière générale, ces porines for-

ment des pores d'un diamètre variant de 1 à 1,4 nm. La structure tridimensionnelle des protéines OmpF et PhoE déterminée par cristallographie montre que le canal est composé de 16 brins β -antiparallèles transmembranaires. Le diamètre du canal est modifié par la présence d'une boucle (la boucle L3) qui se déploie à l'intérieur de celui-ci [11]. Comment les β -lactamines traversent-elles la membrane externe? Les travaux de Nikaido ont montré que la plupart des pénicillines et des céphalosporines diffusent passivement au travers de porines. Ce mode de transport semble être prépondérant chez de nombreuses bactéries à Gram⁻ en raison de la présence de protéines similaires aux porines. D'autres modes de transport sont également possibles. Ainsi, l'imipénème franchit la membrane externe de *P. aeruginosa* via la porine OprD2, un phénomène reposant sur l'analogie de structure entre les acides aminés basiques et la chaîne latérale de l'imipénème [12].

La membrane externe ne constitue pas à elle seule l'élément déterminant de résistance aux β -lactamines. En général, le temps d'accumulation d'une concentration létale en antibiotique reste inférieur au temps de génération des bactéries. Toutefois, si la bactérie produit une β -lactamase, la membrane externe contribue de deux manières à la résistance bactérienne en ralentissant la diffusion des β -lactamines et en concentrant la β -lactamase dans l'espace périplasmique.

L'implication de la membrane externe dans la résistance a été observée chez *E. coli* [13]. La présence d'antibiotiques dans le milieu extérieur permet la sélection des souches dans lesquelles la production des porines est affectée, ce qui entraîne une diminution de perméabilité de la membrane externe. Des phénomènes de résistance sont observés pour les antibiotiques empruntant les voies de passage spécifique. Par exemple, la répression de la synthèse de OprD2 ne permet plus la diffusion de l'imipénème dans le périplasma de *P. aeruginosa* [14]. De cette façon, cette bactérie devient résistante à l'imipénème sans que sa viabilité soit significativement affectée. Un phénomène analogue peut être

observé chez les mycobactéries [15, 16]. Ces micro-organismes se distinguent par la présence d'une épaisse couche externe composée d'acides mycoliques, d'arabinogalactane et de lipides divers. Celle-ci réduit de manière notable l'accès des antibiotiques à leurs cibles. Tout comme chez les bactéries à Gram⁻, la paroi externe n'est pas le seul élément déterminant de résistance. Ainsi, celle de *Mycobacterium fallax* présente une faible perméabilité vis-à-vis des pénicillines. Néanmoins, le temps d'accumulation des céphalosporines de troisième génération (2-3 heures) reste largement inférieur au temps de génération de cet organisme (13 heures). Toutefois, si la bactérie produit une β -lactamase, la concentration minimale létale de la benzyl-pénicilline passe de 2 μ g/ml à 40 μ g/ml.

Enfin, chez *P. aeruginosa*, un système de flux sortant actif, impliquant les produits des gènes *mexA*, *mexB* et *orpM* diminue la concentration moyenne des β -lactamines dans le périplasma [17].

Intégration des différents facteurs

La résistance dépend en fin de compte de l'action conjuguée des différents facteurs. Dans certaines souches de staphylocoques, gonocoques ou méningocoques, on observe à la fois la présence du PBP de faible affinité et d'une β -lactamase. Fort heureusement, les entérocoques résistants responsables d'infections nosocomiales et porteurs d'une β -lactamase (identique à celle des staphylocoques) sont encore peu répandus. Aucun pneumocoque résistant producteur d'une β -lactamase n'a encore été isolé. Chez les bactéries à Gram⁻, la concentration périplasmique de l'antibiotique à l'état stationnaire dépend de sa vitesse de pénétration, de la quantité et des propriétés de la ou des β -lactamases et, éventuellement, de l'efficacité des mécanismes de flux sortant actif. Des modèles permettent, dans les cas les plus simples, de calculer cette concentration d'état stationnaire à partir de la combinaison des deux premiers éléments: perméabilité et β -lactamase. La CMI correspond à la concentration externe qui engendre une concentration périplasmique suffisante pour conduire à

une inactivation « létale » d'un ou de plusieurs PBP. Ces modèles ont été utilisés avec un certain succès pour prédire certaines valeurs de CMI [18, 19] et les modèles peuvent être facilement adaptés pour tenir compte des phénomènes d'efflux (J.M. Frère, résultats non publiés). Ils montrent aussi que, dans la plupart des cas, une modification de perméabilité ne jouera un rôle vraiment important qu'en complément d'une production, même faible, de β -lactamase. Malheureusement, ces analyses sont rendues difficiles par le fait que, même quand on connaît bien les propriétés des β -lactamases et des PBP, on ignore la proportion de chacun de ces derniers qui est nécessaire à une croissance normale des cellules.

Aspects cinétiques

Les β -lactamases à sérine active et les PBP forment avec les pénicillines un adduit de type acylenzyme [9] qui subit une hydrolyse rapide dans le premier cas et une dégradation lente dans le second (figure 3). Cette dernière dégradation, qui consiste, soit en une simple hydrolyse conduisant à la formation d'acide pénicilloïque, soit en une fragmentation plus complexe de la molécule, est généralement trop lente pour avoir une influence significative *in vivo*. L'interaction des deux types d'enzymes avec les β -lactamines répond à un schéma cinétique simple (Tableau I).

Il faut cependant noter que, pour les PBP considérées comme « sensibles », les valeurs de ce paramètre couvrent une large gamme de variation, de 200-300 à plus de 300 000 $M^{-1}s^{-1}$ [20], alors qu'avec les PBP résistantes elles sont égales ou inférieures à 10 $M^{-1}s^{-1}$ [7].

En revanche, les β -lactamases catalysent l'hydrolyse de leurs bons substrats avec une efficacité redoutable: des valeurs de k_2/K' supérieures à $10^6 M^{-1}s^{-1}$ accompagnées de valeurs de k_3 de l'ordre de 1000 s^{-1} ne sont pas exceptionnelles [9]. Pour lutter contre la résistance due à ces dernières enzymes, deux stratégies ont été développées. En modifiant les chaînes latérales des pénicillines et céphalosporines, on a obtenu des composés réagissant bien avec les PBP mais qui échappaient à l'action de certaines β -lactamases. Ainsi, la méthicilline et les céphalosporines sont très mal hydrolysées par la β -lactamase de *S. aureus* tandis que les céphalosporines de troisième génération résistent bien à l'action des β -lactamases plasmidiques les plus répandues, TEM et SHV. Par ailleurs, la découverte de β -lactamines inactivatrices des β -lactamases, comme le clavulanate, le sulbactam et le tazobactam ont permis de développer des médicaments à deux composantes comme l'Augmentin[®], dans lequel le clavulanate inactive la β -lactamase tandis qu'un composé classique, l'amoxicilline, réagit avec les PBP. Nous allons voir comment les bactéries ont elles-mêmes répondu à ces stratégies. A première vue, la solution la plus simple semble être l'acquisition d'une nouvelle enzyme, hydrolysant le nouvel antibiotique ou échappant à l'action de l'inactivateur. On a ainsi isolé des souches produisant jusqu'à trois β -lactamases différentes [21]. La diversité des spécificités de ces enzymes, soulignée plus haut, offre aux bactéries « réceptrices » un vaste choix de possibilités lors de l'acquisition de nouveaux gènes portés par des plasmides ou des transposons. D'autres bactéries se contentent de surproduire un enzyme, soit en augmentant l'effica-

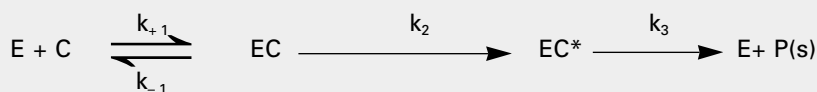
cité du promoteur du gène, soit, et c'est le cas le plus fréquent chez certaines entérobactéries nosocomiales, en supprimant tout contrôle à la synthèse de la β -lactamase. On a isolé une souche de *Serratia* chez laquelle la concentration périplasmique de la β -lactamase de classe C a été estimée à 1 mM, soit 40 g/litre! [22]. Une telle débauche d'enzyme parvient à accroître d'un facteur 1000 la concentration minimale inhibitrice du céfotaxime qui est pourtant hydrolysé par cette enzyme 50 000 fois moins vite qu'un bon substrat comme la céfazoleline. Génétiquement, cette dérégulation est aisée, puisqu'il suffit d'inactiver le produit d'un gène, *ampD*, pour obtenir une synthèse constitutive et massive de l'enzyme [23]. A cet égard, l'apparition de plasmides codant pour des β -lactamases de classe C ne laisse pas d'être inquiétante. D'autres mutations peuvent aussi modifier la spécificité d'une enzyme donnée. L'utilisation, parfois abusive, de céphalosporines de troisième génération, a sélectionné des souches résistantes, produisant des variants des β -lactamases de classe A (TEM, SHV [24]) ou de classe D (OXA [25]) qui hydrolysent ces composés avec une efficacité fortement accrue et différent des enzymes de départ par une à quatre mutations ponctuelles. D'autres mutations ont provoqué l'apparition de β -lactamases résistantes à l'inactivation par le clavulanate et le sulbactam [24]. On a récemment décrit [26] un mutant de la β -lactamase TEM-1 associant des modifications qui, individuellement, conduisent au premier ou au second caractère. Il semble heureusement que les effets ne soient pas strictement additifs, l'hydrolyse des céphalosporines de troisième génération et la résistance aux inactivateurs étant loin d'être aussi marquées que chez les variants « purs » dépourvus de l'autre caractère. Mais, avec le temps, les bactéries pourraient aussi parvenir à résoudre ce problème.

Régulation de la production de β -lactamase

Certains des micro-organismes qui produisent une β -lactamase le font de manière réglée: la présence de β -lactamines dans le milieu ambiant pro-

Tableau I

INTERACTION DE DEUX TYPES D'ENZYMES AVEC LES β -LACTAMINES



E représente l'enzyme, *C* l'antibiotique, *EC* un complexe non covalent, *EC** l'acylenzyme et *P(s)* le ou les produits de la réaction. Les vitesses d'acylation et de désacylation sont caractérisées respectivement par le rapport $k_1/k_2/(k_2 + k_{-1})$ ou k_2/K' et par la constante d'ordre 1 k_3 . La valeur de k_3 étant le plus souvent négligeable, la sensibilité d'un PBP dépend essentiellement de la vitesse d'acylation. C'est une diminution importante du rapport k_2/K' qui est responsable de la faible affinité des PBP « résistants ».

voque une augmentation de la quantité de β -lactamase synthétisée. En ajustant ainsi son effort métabolique aux besoins du moment, la bactérie fait d'évidentes économies d'énergie, mais elle offre peut-être une cible supplémentaire à la thérapie. On pourrait en effet envisager de rendre ces souches sensibles aux β -lactamines en agissant au niveau du mécanisme inducteur de la synthèse de la β -lactamase, ce qui souligne l'intérêt de décrypter les cheminements moléculaires de cette régulation.

Régulation chez les bactéries à Gram⁺

Le système le mieux étudié est celui de *Bacillus licheniformis* (figure 4). Dans le génome de ce micro-organisme, trois gènes (*blaI*, *blaR1* et *blaR2*) interviennent dans la régulation du gène de structure *blaP*, codant pour une β -lactamase de classe A. Les gènes *blaI*, *blaR1* et *blaP* forment un « divergeon », l'orientation des deux gènes régulateurs étant opposée à celle du gène de structure. *BlaI* exerce un contrôle négatif sur la transcription de *blaP*.

C'est un répresseur typique. Le gène *blaR1* a particulièrement retenu l'attention parce qu'il code pour une protéine transmembranaire capable de reconnaître les β -lactamines. Le domaine sensible à la pénicilline de *BlaR1* exposé dans le milieu extérieur en fait un détecteur de la présence de l'antibiotique. L'étude de la topologie de *BlaR1* a montré que la protéine comportait quatre segments transmembranaires, une organisation qui permet d'émettre diverses suggestions quant au processus moléculaire de

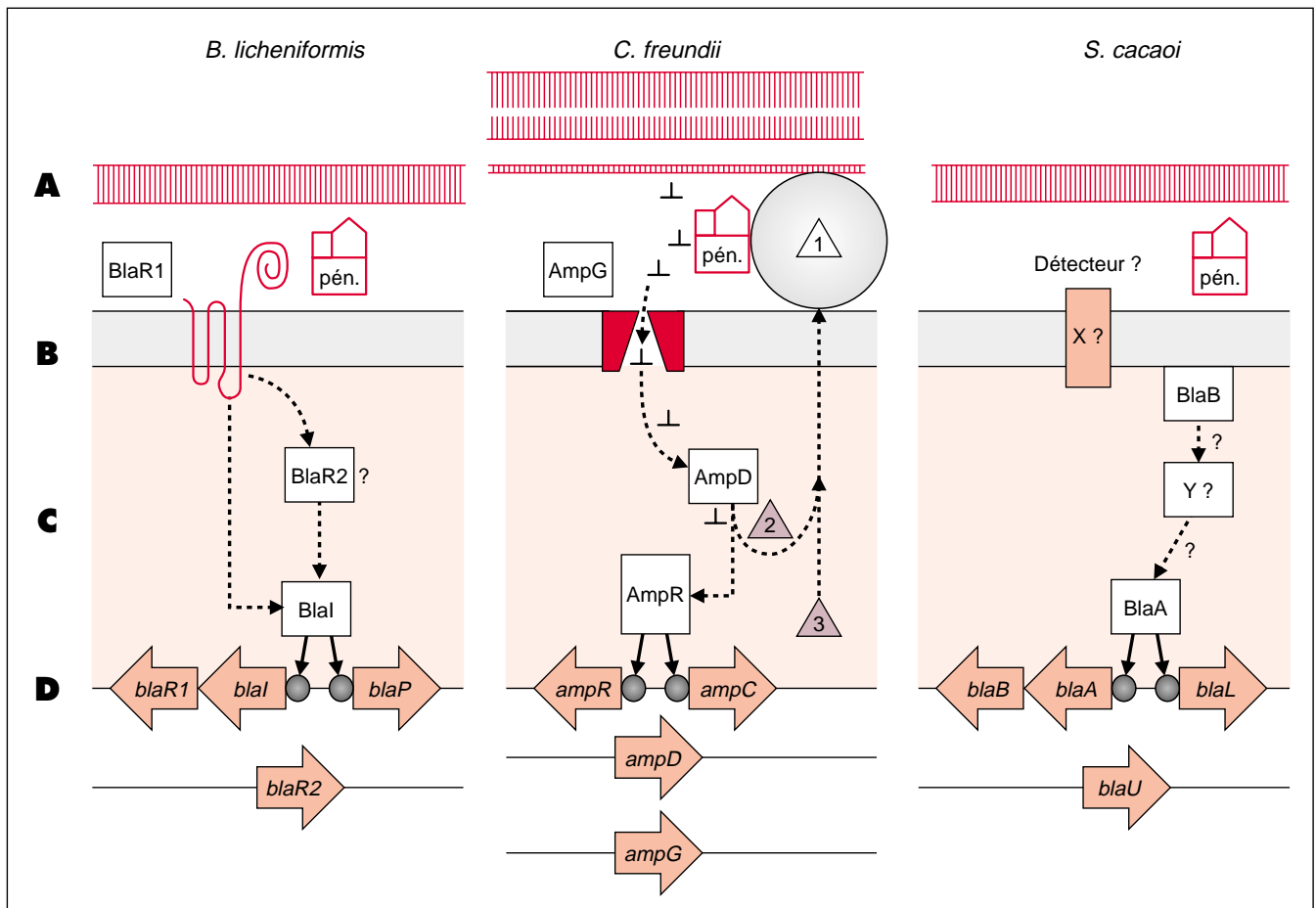


Figure 4. **Représentation schématique des voies de régulation actuellement proposées pour la production de β -lactamase chez *B. licheniformis*, *C. freundii* et *S. cacaoi*.** A : couche de peptidoglycane ; B : membrane cytoplasmique ; C : cytoplasme ; D : génome. Chez *B. licheniformis*, la synthèse de la β -lactamase, *BlaP*, est sous le contrôle de 3 facteurs : *BlaR1*, détecteur de la β -lactamine à la face externe de la membrane cytoplasmique, *BlaI*, répresseur de la transcription du gène *blaP*, et *BlaR2*. L'orientation des gènes régulateurs *blaR1* et *blaI* est opposée à celle de *blaP*. Chez *S. cacaoi*, un système très voisin de régulation de synthèse de la β -lactamase *BlaL* est décrit. Chez les bactéries à Gram⁻ (*C. freundii*), quatre gènes au moins participent à la régulation du gène codant pour la β -lactamase de classe C, *AmpC*, ou de classe A, *Cum A* : *ampR* et *cumR* sont répresseurs en l'absence d'induction, activateurs en présence d'induction. Celle-ci est fournie par l'activation des gènes *ampG* (qui codent pour une perméase) et *ampD* (qui code pour une amidase impliquée dans le recyclage des produits de dégradation de peptidoglycane qui pénètrent dans la bactérie via l'*AmpG*) et *ampE* (dont la fonction du produit est inconnue). Le cercle 1 représente le complexe multi-enzymatique (hydrolases-synthétases) de biosynthèse-remodelage du peptidoglycane. Les flèches 2 et 3 désignent respectivement la voie de recyclage et celle de biosynthèse du peptidoglycane. Les points d'interrogation marquent les étapes et les intermédiaires hypothétiques.

transmission d'un signal de l'extérieur vers le cytoplasme [27].

L'existence du troisième gène régulateur *blaR2* ne repose que sur des arguments génétiques. Il s'agit d'un locus, non lié au groupe que forment les trois autres gènes et dont la mutation entraîne une expression constitutive de β -lactamase.

Les gènes *blaI*, *blaR* et *blaP* de *S. aureus* sont organisés de façon similaire sur le transposon Tn552. Chez *S. aureus* et *epidermidis*, le gène de résistance *mecA* déterminant le PBP2a ou 2' est intégré dans un système apparenté.

La régulation de la production de β -lactamase a aussi été étudiée chez *Streptomyces cacaoi*. Deux gènes régulateurs *blaA* et *blaB* ont été identifiés [28] en amont et décrits comme divergeant du gène de structure contrôlé, *blaL*. BlaA est un activateur de transcription appartenant à la famille LysR. BlaB n'a pas de correspondant dans les autres systèmes régulateurs. Des immunostests ont permis de le localiser à la face interne de la membrane cytoplasmique [29]. Sa fonction reste inconnue.

Régulation chez les bactéries à Gram⁻

Chez les entérobactériacées et certaines espèces apparentées, un gène chromosomique code pour une β -lactamase de classe C (*ampC*, entérobactéries et *Pseudomonas*) ou A (*cumA*, *Proteus vulgaris*) (figure 4). Quatre gènes au moins participent à la régulation. *ampR* et *cumR* codent pour des activateurs transcriptionnels de la famille LysR. Ici aussi, gènes régulateur et de structure sont adjacents et transcrits de façon divergente, le produit AmpR ou CumR se fixant sur la portion intercistronique. A la différence de BlaA, AmpR et CumR n'agissent comme activateurs que dans des conditions inductrices. En l'absence d'induction, ils deviennent répresseurs.

Des gènes non liés aux précédents se sont révélés nécessaires à l'induction. *ampG*, qui code pour une perméase ou un élément de perméase, occupe un locus isolé, tandis que *ampD* et *ampE* sont groupés. Le rôle d'AmpE n'est pas tout à fait éclairci. Son absence reste sans effet sur l'induction, mais un AmpE altéré (délétion de l'extrémité carboxy-terminale)

rend la cellule très peu inductible. La protéine AmpD, une amidase, est impliquée dans le recyclage des produits de dégradation du peptidoglycane qui pénètrent dans la cellule *via* AmpG. Dans des conditions normales, AmpR fixe un des nucléotides précurseurs de la synthèse du peptidoglycane et réprime la transcription du gène *ampC*. Une pénétration accrue des produits de dégradation du peptidoglycane, suite à l'inactivation de certains PBP par une pénicilline, ou l'inactivation d'AmpD conduisent à l'accumulation du substrat de ce dernier qui, en se fixant à AmpR, le transforme en activateur de transcription [30]. On ignore si cette fixation implique le déplacement du ligand « normal » d'AmpR, le précurseur nucléotidique.

La structure des enzymes reconnaissant la pénicilline

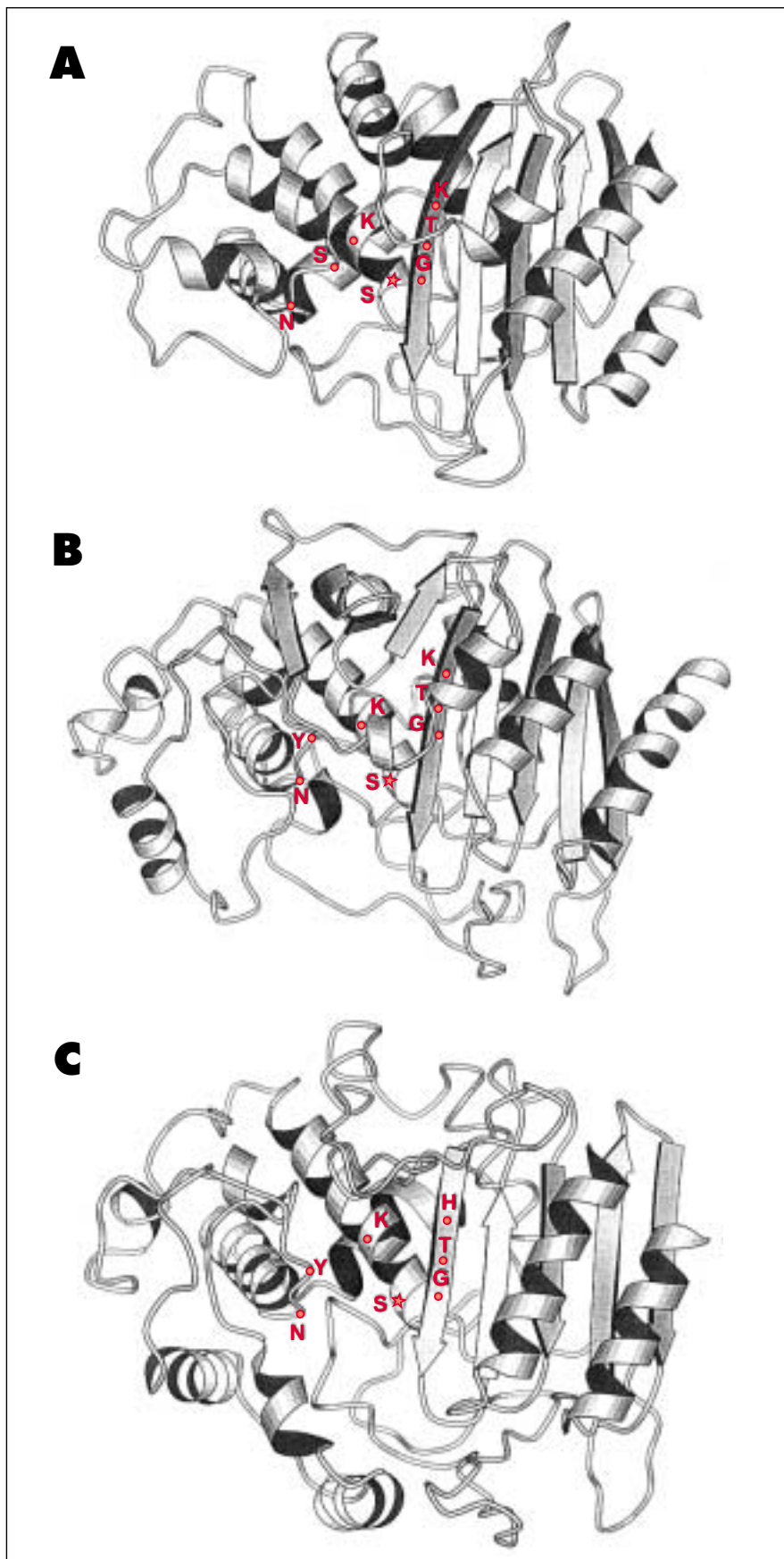
La détermination des structures tridimensionnelles des β -lactamases et PBP par cristallographie aux rayons X a apporté une contribution inestimable à l'analyse des mécanismes de résistance tout d'abord en soulignant [31] une similitude étonnante dans les architectures de ces protéines. Elles sont formées par la juxtaposition d'un domaine tout en hélices α et d'un domaine comportant des hélices α et des feuilletts β à la jonction desquels se trouve le site actif (figure 5). Actuellement, les structures de plusieurs β -lactamases des classes A et C et de deux PBP ont été publiées [32-34]. Quoique l'analyse des structures primaires des différentes enzymes ne montre pas d'isologie significative, les structures tertiaires mettent en évidence, autour du site actif, des groupes de résidus conservés, de nature identique ou de fonction semblable, démontrant ainsi que ces protéines appartiennent à une même famille de pénicilloylsérine transférases. Sur cette base, des éléments équivalents ont pu être identifiés dans les séquences de toutes les autres enzymes dont la structure tertiaire est encore inconnue (Tableau II). Ainsi, la sérine active est à l'extrémité amino-terminale d'une longue hélice et, trois résidus plus loin, soit après un tour d'hélice, on retrouve toujours une lysine dont

la longue chaîne latérale pointe dans le site actif. Le second élément, sur une boucle à gauche du site actif sur la figure 5, comporte un résidu hydroxylé (Tyr ou Ser) et, après un résidu variable, une asparagine ou, plus rarement, une sérine ou une cystéine. Lui faisant face, à droite du site actif et sur le brin β le plus interne, on trouve une triade composée d'un résidu basique (Lys, Arg ou His), d'un résidu hydroxylé (Thr ou Ser) et d'une glycine. La fonction de ces différents groupements a été explorée par mutagenèse dirigée mais il faut reconnaître que les résultats ne permettent pas encore de proposer un rôle bien défini pour chacun d'entre eux. Il est même probable que des résidus semblables situés dans des positions équivalentes n'aient pas tout à fait la même fonction dans les différentes classes d'enzymes. Ainsi, la stabilité de l'acyl-enzyme formé avec les PBP reste mal expliquée par rapport à l'hydrolyse rapide subie par l'adduit équivalent obtenu avec les β -lactamases de classe C. En dehors de celle de la sérine active elle-même, seule la conservation absolue de la glycine du troisième élément est bien comprise: dans cette position, toute chaîne latérale interférerait fortement avec la liaison de la pénicilline et, pour les PBP, du substrat peptidique au site catalytique.

Récemment, les structures de deux β -lactamases à Zn^{2+} ont été déterminées (figure 6). Elles ne ressemblent à celles d'aucune autre protéine connue [35, 36]. Ces enzymes peuvent fixer deux ions Zn^{2+} dans des sites rapprochés, mais les effets du second métal varient selon l'enzyme, ayant une action tantôt inhibitrice, tantôt activatrice. Le Zn^{2+} peut être remplacé par d'autres cations divalents (Cd^{++} , Co^{++}) ce qui conduit à des modifications du profil de spécificité. Il semble bien cependant que le Zn^{2+} soit l'ion normalement présent dans ces enzymes.

L'approche de la chimie théorique

Les méthodes qui peuvent donner des détails précis sur les structures des macromolécules (cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire) demandent des temps d'exposition allant de



quelques minutes à plusieurs heures. Le cinéticien, de son côté, met en évidence des phénomènes rapides, impliquant la formation d'intermédiaires dont la durée de vie ne dépasse pas quelques millisecondes. Ces éléments conduisent à l'élaboration de modèles visant à donner une base structurale aux différentes étapes du parcours de la réaction, depuis le complexe réactif de Michaelis jusqu'aux produits terminaux en passant par l'acyl-enzyme.

Réaction nucléophile

Les enzymes à sérine active réalisent une attaque nucléophile du ligand au travers d'un mécanisme très général aussi bien présent dans les PBP que dans la famille des trypsines. La tête alcool devient réactive par transfert de son hydrogène sur un accepteur transitoire qui, à son tour, le restitue à l'hétéro-atome de la liaison en cours de rupture *via* plusieurs intermédiaires.

A l'inverse d'une réaction de méthanolyse réalisée dans un bécher, la réaction enzymatique acquiert sa spécificité à l'égard de certains ligands par la disposition spatiale d'acides aminés qui sont différents d'une enzyme à l'autre et en interaction avec la sérine et le ligand lui-même.

Mécanique moléculaire

Cette étude des interactions moléculaires fait appel aux méthodes de la chimie théorique. Pour décrire un ensemble de plus de 5 000 atomes

Figure 5. **Structures en ruban des β -lactamases de classe A (A, TEM-1), de classe C (B, Enterobacter cloacae P99) et de la DD-peptidase de Streptomyces R61 (C).** Les groupes de résidus conservés sont indiqués (*): l'activité pénicilloyl-sérine-transférase met en jeu (1) la sérine active (S*) à l'extrémité amino-terminale d'une hélice α suivie, après un tour d'hélice, d'un résidu lysine (K); (2) à gauche du site actif, un résidu hydroxylé (sérine S ou tyrosine Y) suivi d'un résidu basique (asparagine N); (3) sur le brin β faisant face au site actif, trois résidus conservés: lysine K (ou histidine H), thréonine T, glycine G.

Tableau II

ÉLÉMENTS CONSERVÉS DANS LES SITES ACTIFS DES PBP ET DES β -LACTAMASES

	1	2	3
PBP de masse moléculaire élevée			
Classe A (1b, <i>E. coli</i>)	S*LAK	SMN	KTG
Classe B (2x, <i>S. pneumoniae</i>)	S*TMK	SSN	KSG
(5, <i>E. hirae</i>)	S*TFK	SDN	KTG
PBP de faible masse moléculaire			
Streptomyces R61	S*VTK	YSN	HTG
<i>E. coli</i> , PBP5	S*LTK	SGN	KTG
Streptomyces K15	S*TTK	SGC	KTG
β-lactamases			
Classe A	S*XXK	SDN S	KTG RS
Classe C	S*XXK	YXN	KTG
Classe D	S*TFK	YAN	KTG

La sérine active est marquée (S*). Les enzymes de structure tridimensionnelle connue sont repris en caractère gras. Le PBP2x de *S. pneumoniae* est « sensible » aux β -lactamines tandis que le PBP5 d'*E. hirae* est « résistant ». Les groupes de résidus 1, 2 et 3 correspondent au site actif (1) et aux groupes de résidus décrits sur la figure 4. Code à une lettre des acides aminés : 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.

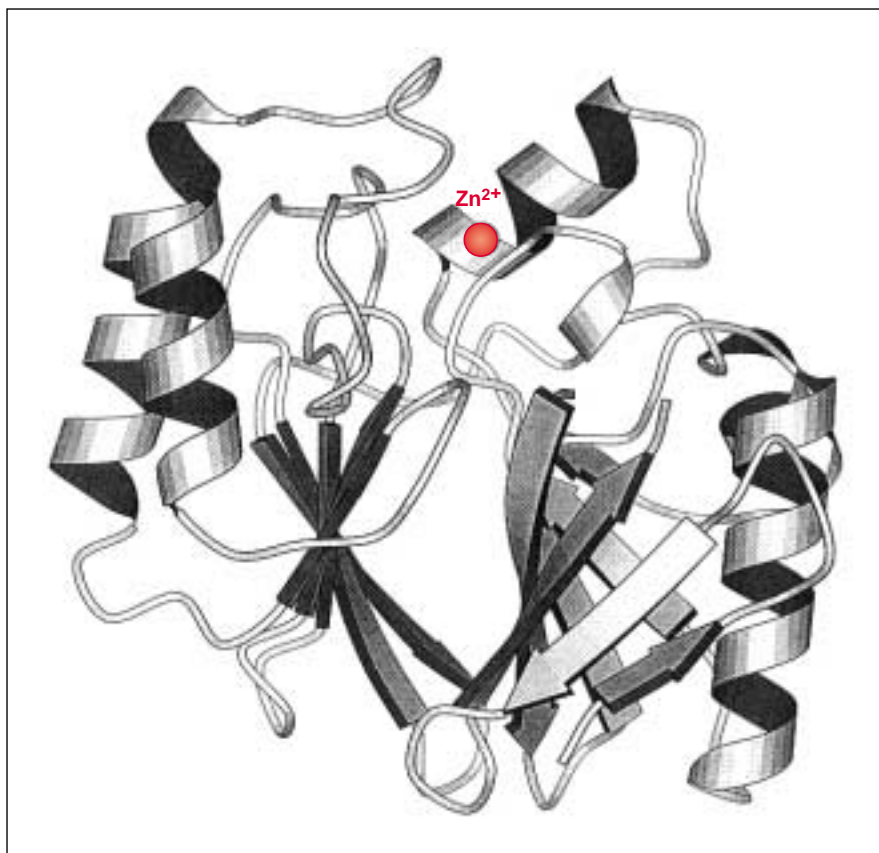


Figure 6. Structure en ruban de la β -lactamase à Zn^{2+} de *Bacillus cereus* (code PDB: 1BMC).

constituant une protéine, de nombreuses méthodes approchées ont été développées depuis 25 ans. Celles de la mécanique moléculaire se fondent sur l'idée simple qu'une vingtaine de briques seulement permettent la construction de l'ensemble. Au cours du temps, des paramètres spécifiques de chaque acide aminé et associés à des expressions énergétiques simples, ont été de mieux en mieux affinés pour arriver à une description satisfaisante des entités à l'équilibre comme le complexe de Michaelis et l'acylenzyme. Grâce à la grande simplicité de ces expressions énergétiques, des simulations dynamiques peuvent être effectuées, donnant ainsi une idée de la plasticité de la protéine.

La limitation importante imposée par la mécanique moléculaire réside dans le paramétrage des différentes entités. Ainsi, un jeu de paramètres sera défini pour une lysine neutre sous forme d'amine primaire et un autre sera nécessaire pour décrire une lysine chargée sous forme d'ion alkylammonium. Autrement dit, une telle méthode ne permet pas de suivre l'évolution d'une réaction au cours de laquelle des liaisons chimiques se brisent ou se forment [37].

Chimie quantique

Le chemin de la réaction décrit le parcours des entités depuis les réactifs jusqu'aux produits en passant par cette structure très particulière qu'est l'état de transition. A ce point, la structure à l'équilibre présente un maximum d'énergie sur une coordonnée de réaction et un minimum sur toutes les autres [38]. C'est l'énergie de l'état de transition qui détermine la barrière d'activation de la réaction considérée par rapport à l'énergie des réactifs.

A l'inverse de la mécanique moléculaire, les méthodes de la chimie quantique ne sont pas paramétrées. Dans une vue anthropomorphique, elles décrivent les molécules comme des associations à but lucratif d'atomes au moyen du calcul des orbitales moléculaires, domaines de probabilité de présence de chaque électron. Vu le grand nombre d'électrons considérés, la mise en œuvre de ces méthodes demande des puissances de calculs énormes qui limi-

tent considérablement leur champ d'application. Aujourd'hui, les ordinateurs parallèles installés dans notre laboratoire permettent de traiter des ensembles d'environ une centaine d'atomes, soit une dizaine d'acides aminés. A partir des coordonnées de l'enzyme isolée déterminées par cristallographie, on construit des modèles ne comportant que les acides aminés voisins de la sérine nucléophile et du ligand. La surface d'énergie sur laquelle les méthodes algébriques de la chimie quantique peuvent rechercher et localiser les points critiques sur le chemin de réaction est ainsi définie [39]. Les résultats obtenus permettent de préciser les propriétés du site enzymatique qui conduisent à une diminution de la hauteur de la barrière d'activation par rapport à une réaction non catalysée.

Les résultats du calcul sont en bonne relation avec les données thermodynamiques dérivées des données cinétiques, aussi bien pour l'enzyme native que pour des mutants dans lesquels les acides aminés présumés importants dans la catalyse, ont été remplacés par d'autres résidus portant des chaînes latérales différentes [40].

Perspectives

Les protéines à sérine active reconnaissant la pénicilline catalysent avec plus ou moins d'efficacité la réaction nucléophile d'ouverture du cycle lactame. Bien sûr, dans le cas des β -lactamases, la réaction ne s'arrête pas au stade de l'acyl-enzyme mais se poursuit par hydrolyse du lien ester formé pour régénérer la protéine libre. Néanmoins, ces enzymes diffèrent sensiblement entre elles par leur composition en acides aminés et par les dispositions spatiales des composantes du site actif. La flexibilité conformationnelle des deux cycles de la pénicilline jouerait donc un rôle prépondérant pour expliquer son adaptabilité face à des récepteurs différant par leur nature et leur fonction.

Les calculs réalisés sur des modèles de sites catalytiques ont mis en évidence cette extraordinaire adaptabilité spatiale sous la forme de mouvements concertés impliquant l'ouverture du cycle à quatre pièces

et la déformation du cycle qui lui est accolé. Dans la conception de nouveaux ligands, plus spécifiques et plus efficaces, cet aspect de souplesse au sens géométrique, longtemps négligé, devra être pris en compte.

Conclusions

Pour mieux répondre au développement des différents types de résistance bactérienne aux antibiotiques, nous nous devons de mieux comprendre les mécanismes catalytiques des enzymes qui en sont responsables. Seule une approche multidisciplinaire permet d'atteindre ce but ■

Remerciements

Les auteurs remercient tous leurs collaborateurs du CIP pour leur contribution aux travaux décrits dans cette revue. Ces études ont été rendues possibles par le support financier de l'Université de Liège, du FNRS, des Pôles d'Attraction Interuniversitaires (PAI P4/03), de plusieurs Actions de Recherche Concertées avec le Gouvernement belge et de divers contrats avec la Région wallonne et l'Union européenne.

RÉFÉRENCES

1. Van Heijenoort J. Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 39-54.
2. Ghuyesen JM. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol* 1994; 2: 372-80.
3. Vicente M, Errington J. Structure, function and control in microbial division. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1-7.
4. Shockman GD, Høltje JV. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 131-66.
5. Berger-Bächi B. Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol* 1994; 2: 389-93.
6. Joris B, Hardt K, Ghuyesen JM. Induction of β -lactamase and low-affinity penicillin-binding protein 2' synthesis in Gram-positive bacteria. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 505-15.
7. Zorzi W, Zhou XY, Dardenne O, Lamotte J, Raze D, Pierre J, Gutmann L, Coyette J. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5, PBP5fm, in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4948-57.

8. Spratt BG. Resistance to β -lactam antibiotics. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 517-34.

9. Frère JM. β -Lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol* 1995; 16: 385-95.

10. Bush K. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.

11. Schulz GE. Structure function relationship in porins as derived from a 1.8 Å resolution crystal structure. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 343-62.

12. Benz R. Uptakes of solutes through bacterial outer membranes. In: Ghuyesen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 397-423.

13. Nikaido H. Role of permeability barrier in resistance to β -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1989; 27: 197-231.

14. Trias J, Dufresne J, Levesque RC, Nikaido H. Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 33: 1201-6.

15. Chamber HF, Moreau D, Yajho D, Mûch C, Wagner C, Hackbarth C, Kocagöz S, Rosenberg E, Hardley WK, Nikaido H. Can penicillins and other β -lactam antibiotics be used to treat tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2620-4.

16. Quinting B, Reyat JR, Monnaie D, Amicosante G, Pelicic V, Gicquel B, Frère JM, Galleni M. Contribution of β -lactamase production to the resistance of mycobacteria to β -lactam antibiotics. *FEBS Lett* 1997; 406: 275-8.

17. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of MexA-MexB-OrpM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1948-53.

18. Nikaido H, Normark S. Sensitivity of *Escherichia coli* to various β -lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β -lactamases: a quantitative predictive treatment. *Mol Microbiol* 1987; 1: 29-36.

19. Frère JM. Quantitative relationship between sensitivity to β -lactam antibiotics and β -lactamase production in Gram-negative bacteria. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1415-26.

20. Frère JM, Joris B. Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *CRC Crit Rev Microbiol* 1985; 11: 299-396.

21. Yang Y, Wu P, Livermore DM. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyses penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 755-8.

22. Hechler U, Van den Weghe M, Martin HH, Frère JM. Overproduced β -lactamase and the outer membrane barrier as resistance factors in *Serratia marcescens* highly resistant to β -lactamase stable β -lactam antibiotics. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 1275-90.

RÉFÉRENCES

23. Jacobs C, Frère JM, Normark S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell* 1997; 88: 823-32.
24. Bush K, Jacoby G. Nomenclature of TEM β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 1-3.
25. Danel F, Hall LMC, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785-90.
26. Sirot D, Recule C, Chaïbi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Claris C, Labia R, Sirot J. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1322-5.
27. Hardt K, Joris B, Lepage S, Brasseur R, Lampen JO, Frère JM, Fink AL, Ghuysen JM. The penicillin sensory transducer, BlaR, involved in the inducibility of β -lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via a four α -helix bundle. *Mol Microbiol* 1997; 23: 935-44.
28. Lenzini VM, Magdalena J, Fraipont C, Joris B, Matagne A, Dusart J. Induction of a *Streptomyces cacaoi* β -lactamase gene cloned in *S. lividans*. *Mol Gen Genet* 1992; 235: 41-8.
29. Magdalena J, Joris B, Van Beeumen J, Brasseur R, Dusart J. Regulation of the β -lactamase BlaL of *Streptomyces cacaoi*: the product of the *blaB* regulatory gene is an internal membrane-bound protein. *Biochem J* 1995; 311: 155-60.
30. Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO J* 1994; 13: 4684-94.
31. Kelly JA, Dideberg O, Charlier P, Wéry JP, Libert M, Moews PC, Knox JR, Duez C, Fraipont C, Joris B, Dusart J, Frère JM, Ghuysen JM. On the origin of bacterial resistance to penicillins. *Science* 1986; 231: 1429-31.
32. Knox JR, Moews PC, Frère JM. Molecular evolution of bacterial β -lactam resistance. *Chem Biol* 1996; 3: 937-47.
33. Jelsch C, Mourey L, Masson JM, Samama JP. Crystal structure of *Escherichia coli* TEM-1 β -lactamase. *Proteins Struct Funct Genet* 1993; 16: 364-83.
34. Pares S, Mouz N, Petillot Y, Hakenbeck R, Dideberg O. X-Ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 284-9.
35. Carfi A, Pares S, Duée E, Galleni M, Duez C, Frère JM, Dideberg O. The 3-D structure of a zinc-metallo β -lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J* 1995; 14: 4914-21.
36. Concha NO, Rasmussen BA, Bush K, Herzberg O. Crystal structure of the wide spectrum binuclear zinc β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Structure* 1996; 4: 823-36.
37. Ghuysen JM, Dive G. Biochemistry of the penicilloyl serine transferases. In: Ghuysen JM, Hakenbeck R, eds. *Bacterial cell wall*. Amsterdam: Elsevier, 1994: 103-29.
38. Culot P, Dive G, Nguyen VH, Ghuysen JM. A quasi-Newton algorithm for first-order saddle-point location. *Theoret Chim Acta* 1992; 82: 189-205.
39. Dive G, Dehareng D, Ghuysen JM. A detailed study of a molecule into a molecule: the N-acetyl-L-tryptophanamide in an active site model of the α -chymotrypsin. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 2548-56.
40. Dive G, Dehareng D, Peeters D. Proposition for the acylation mechanism of the serine proteases: a one step process? *Int J Quant Chem* 1996; 58: 85-107.

Summary

Bacterial resistance to β -lactam antibiotics

The emergence of β -lactam resistant pathogenic strains has recently become a worrying clinical problem. In this review, the various factors which contribute to bacterial resistance are described and discussed. The study of the three-dimensional structure of β -lactamases and penicillin-binding proteins supplies the cornerstone for the design of new antibacterial agents. This type of approach rests on the understanding of fundamental phenomena such as cell division, enzyme catalysis and gene control and covers a wide range of scientific fields, from microbiology to the study of enzymatically catalysed reactions by the methods of quantum chemistry.

TIRÉS À PART

J.M. Frère.