

Clivage sélectif de la liaison D-Ala-D-Lac : nouvelle stratégie pour combattre la résistance à la vancomycine

Ivo G. Boneca

> Le développement d'un arsenal croissant d'antibiotiques depuis la commercialisation de la pénicilline a donné l'illusion que les maladies infectieuses n'étaient plus une menace pour la santé publique. L'utilisation d'antibiotiques, et ce quelle que soit leur nature, est devenue tellement courante, voire abusive et synonyme d'efficacité à toute épreuve, que la notion d'organismes réfractaires à ces antibiotiques est désormais quasi inexistante.

Néanmoins, bien avant l'usage de la pénicilline en clinique, Abraham et Chain [1] avaient mis en évidence l'existence de souches de *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) capables d'inactiver le pouvoir antimicrobien de cet antibiotique. Depuis, le pourcentage des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques n'a cessé d'augmenter. C'est ainsi que 40-60 % des souches cliniques de *S. aureus*, l'agent responsable de nombreuses infections nosocomiales, sont actuellement résistantes à tous les antibiotiques à l'exclusion de la vancomycine [2], considéré comme l'antibiotique de dernier recours contre les infections causées par des bactéries à Gram positif. *S. aureus* est un pathogène remarquable, dont le pouvoir pathogène va d'un simple abcès à la septicémie, et dont certaines complications (endocardites, méningites ou ostéomyélites), parfois mortelles, sont souvent source de séquelles.

Malheureusement, les entérocoques, bactéries proches des staphylo-

coques, et elles aussi responsables de maladies nosocomiales surtout chez des patients immunodéprimés, ont acquis la capacité de résister à l'action bactéricide de la vancomycine [3]. Cette résistance à la vancomycine est transmissible *via* des éléments génétiques mobiles. *In vitro*, le transfert de ces déterminants génétiques de résistance des entérocoques vers *S. aureus* a été accompli avec succès [4] soulevant une inquiétude légitime quant à une possible transmission *in vivo*. Ce transfert *in vivo* a déjà été mis en évidence des entérocoques aux streptocoques du groupe B [5], et un transfert identique à *S. aureus* serait catastrophique d'un point de vue clinique.

La vancomycine est le chef de file de la classe des antibiotiques glycopeptidiques. Les glycopeptides, comme les β -lactamines, inhibent la synthèse du peptidoglycane des bactéries. Le peptidoglycane est un hétéropolymère présent exclusivement chez les bactéries, comparable à une cote de maille entourant la bactérie. Ainsi, le peptidoglycane contribue-t-il au maintien de l'intégrité cellulaire et, en son absence, il y aurait une lyse des bactéries entraînant la mort cellulaire. Il est donc tout à fait justifié de privilégier la voie de synthèse de ce peptidoglycane comme cible thérapeutique.

La synthèse du peptidoglycane fait intervenir trois étapes majeures (Figure 1) : une étape cytoplasmique de synthèse du précurseur UDP-acide-N-

Unité de Pathogénie
Bactérienne des Muqueuses,
Institut Pasteur, 25-28, rue
du Docteur Roux, 75015
Paris, France

acétylmuramique-(MurNAc)-pentapeptide ; puis une étape de translocation des précurseurs à travers la membrane cytoplasmique; enfin, une dernière étape de polymérisation du peptidoglycane à partir de ces précurseurs lipidiques. La grande majorité des bactéries synthétisent des précurseurs qui ont une terminaison carboxylique D-Ala-D-Ala, et c'est cette terminaison qui est reconvenue par la vancomycine. La vancomycine, en se liant très fortement à la terminaison D-Ala-D-Ala, bloque les précurseurs au stade lipidique [6], et inhibe par voie de conséquence la synthèse du peptidoglycane, entraînant inévitablement la mort cellulaire.

La grande majorité (95%) des entérocoques résistants à la vancomycine isolés en clinique sont porteurs des déterminants génétiques *vanA* ou *vanB* [3]. Ces déterminants sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles (transposons) présents sur des plasmides conjugables. Les souches *vanA* ou *vanB* se distinguent des autres par une terminaison carboxylique des précurseurs de type D-Ala-D-Lac au lieu de D-Ala-D-Ala. Le peptidoglycane synthétisé par ces bactéries résistantes a une structure identique à celle des souches sensibles. En revanche, l'affinité de la vancomycine pour cette extrémité altérée D-Ala-D-Lac est diminuée d'un facteur 1000 [7]. Le niveau de résistance des souches est directement

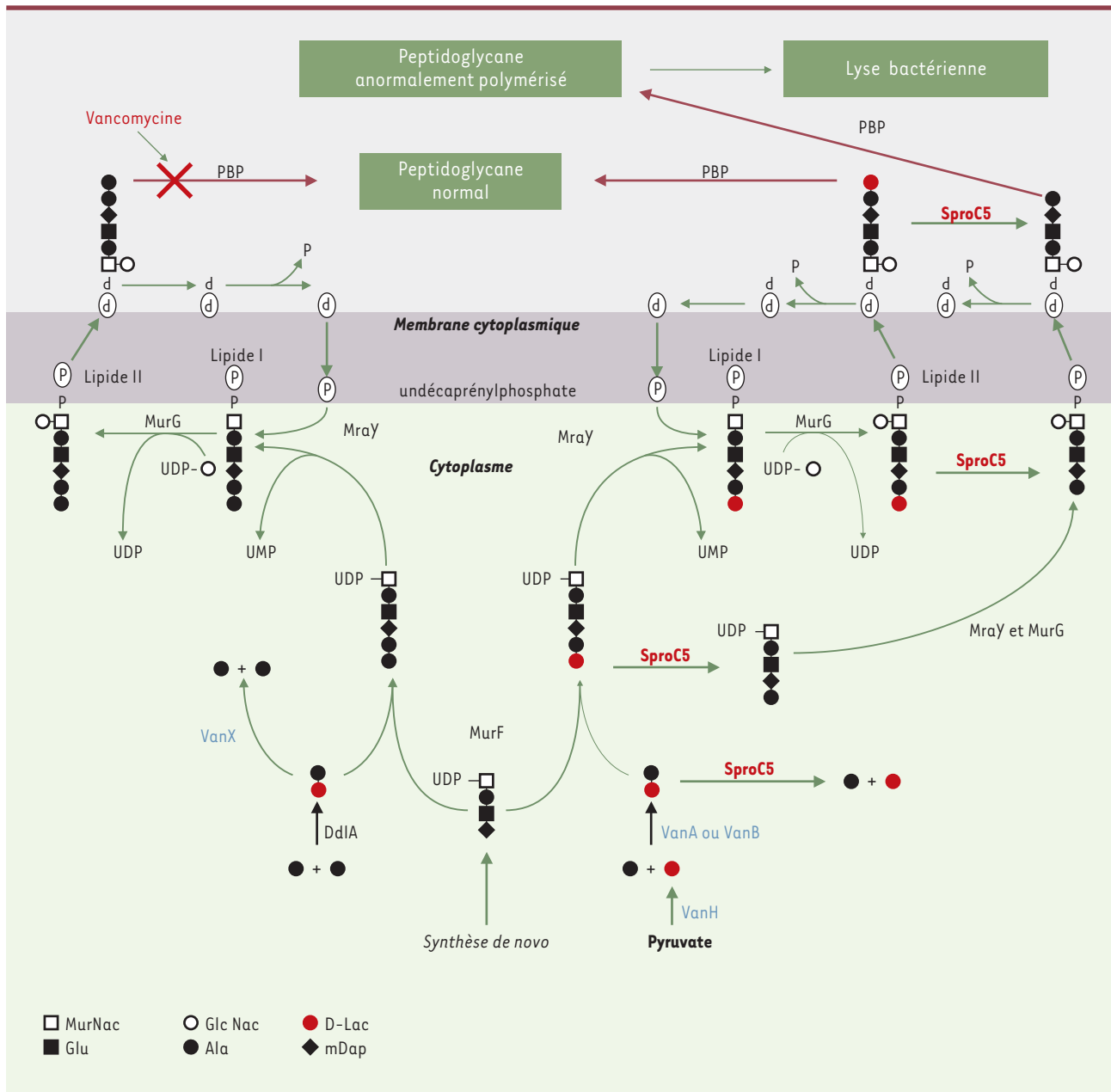


Figure 1. Voie de synthèse du peptidoglycane. Des souches sensibles à la vancomycine synthétisent exclusivement des précurseurs se terminant par le motif D-Ala-D-Ala. La vancomycine inhibe la synthèse du peptidoglycane, en se fixant fortement sur l'extrémité des précurseurs. Dans des souches résistantes, l'extrémité normale (D-Ala-D-Ala) est remplacée par une extrémité modifiée D-Ala-D-Lac (précurseurs représentés par des boules rouges). Pour ce remplacement, les protéines VanA (ou VanB), VanH et VanX sont essentielles (en bleu). Les entérocoques n'ont pas d'activité pyruvate déshydrogénase endogène, d'où le caractère essentiel de VanH. VanA (ou VanB) catalyse la formation de la liaison ester D-Ala-D-Lac que la protéine endogène DdIA est incapable de catalyser. Finalement, VanX code pour une D-Ala-D-Ala dipeptidase essentielle pour enrichir la bactérie en précurseurs D-Ala-D-Lac. Notre stratégie est analogue à celle que la bactérie utilise pour devenir résistante. SProC5 peut agir à différentes étapes de la voie métabolique alternative. En hydrolysant le depsipeptide D-Ala-D-Lac, SProC5 agit de façon analogue à VanX. La diminution de la concentration de D-Ala-D-Lac nous paraît le moyen le plus efficace pour contrer le mécanisme de résistance puisqu'il touche directement au rapport précurseurs normaux/ précurseurs modifiés. Néanmoins, cela suppose que SProC5 diffuse librement à travers la membrane cytoplasmique. SProC5 peut également hydrolyser la terminaison D-Ala-D-Lac une fois incorporé dans la structure pentapeptidique entraînant l'accumulation de précurseurs tétrapeptidiques. Ces précurseurs peuvent être utilisés exclusivement en tant que donneurs lors de la polymérisation du peptidoglycane par les PBP (protéines liant la pénicilline ou *penicillin-binding proteins*). Ceci entraînera inévitablement une lyse cellulaire par manque de précurseurs accepteurs : seuls des précurseurs pentapeptidiques peuvent être utilisés comme accepteurs.

(Figure 2). Nous avons trouvé que la molécule SProC5 était la plus active (deux fois plus efficace que le peptide 4 α : hydrolyse de 50 % du D-Ala-D-Lac en 24 heures). Sa plus grande activité est due à une nature plus nucléophile du groupe hydroxyle de SProC5, confirmée par des études de RMN et de modélisation structurale.

La nature peptidique de la molécule 4 α était un handicap pour des études d'activité biologique. Au contraire, SProC5 étant non peptidique, nous avons pu tester son activité contre une souche d'*Enterococcus faecium* très résistante à la vancomycine. Cette souche EF228 est *vanA* positive et a une CMI (concentration minimale inhibitrice) pour la vancomycine de 1000 $\mu\text{g/ml}$. En combinant la vancomycine avec 50 mM de SProC5, nous pouvions inhiber la croissance de la souche avec 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine. L'activité bactéricide de la combinaison vancomycine-SProC5 a été confirmée en dénombrant le nombre de colonies viables. En combinant 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine et 50 mM de SProC5, nous avons diminué de 3 ordres de magnitude la viabilité cellulaire par rapport à la vancomycine (250 $\mu\text{g/ml}$) ou SProC5 (50 mM) utilisés seuls. Cet effet a été encore plus prononcé en combinant 250 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine et 50 mM de SProC5 avec une diminution de la viabilité de 4 ordres de magnitude. La synergie entre la vancomycine et SProC5 est dose-dépendante et, seul SProC5, est incapable d'inhiber la souche EF228.

L'activité biologique de SProC5 aurait pu être un fait du hasard. Pour corrélérer son activité biologique avec son activité d'hydrolyse du D-Ala-D-Lac, nous avons comparé l'activité de SProC5 soit à celle d'un autre dérivé prolinol N-acétylé SProC2 moins efficace *in vitro*, soit à celle de molécules témoins (RProC5, son énantiomère, et le linker C5, sous-unité de SProC5).

Effectivement, SProC2 en combinaison avec la vancomycine était moins efficace que SProC5. De plus, les molécules témoins n'avaient aucune activité

synergique avec la vancomycine, suggérant que c'est bien sa capacité d'hydrolyser la liaison D-Ala-D-Lac qui explique l'efficacité de SProC5. Finalement, nous avons testé toutes ces molécules en présence d'une souche bactérienne sensible à la vancomycine, et dont les précurseurs du peptidoglycane ont une extrémité D-Ala-D-Ala. Cette souche s'est avérée complètement insensible à leur combinaison avec la vancomycine, indiquant la spécificité d'action de SProC5 vis-à-vis de souches résistantes synthétisant des précurseurs avec une extrémité D-Ala-D-Lac.

Le clivage sélectif de la liaison D-Ala-D-Lac présente exclusivement dans des souches résistantes représente une nouvelle stratégie thérapeutique. Celle-ci a l'avantage de réduire les moyens de pression sélective - la vancomycine reste le seul vrai antibiotique - l'utilisation de SProC5 n'engendre pas une pression sélective puisque les souches sensibles sont indifférentes à sa présence. Dans les souches résistantes, SProC5 agit sur un substrat contrairement à d'autres antibiotiques qui inhibent une activité biochimique, d'où un risque diminué de développement de résistance. Des études plus poussées sur des analogues de SProC5 plus actifs *in vitro* et contre des souches résistantes, permettraient d'envisager des études dans des modèles animaux, et, éventuellement, de valider cette nouvelle approche thérapeutique. \diamond

A novel approach to counteract vancomycin resistance in bacteria

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940; 146: 837-9.
2. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 327-32.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 686-707.
4. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 72: 195-8.
5. Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche P, Trieu-Cuot P. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 24-9.
6. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 1996; 4: 401-7.
7. Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 1991; 30: 10408-15.
8. Arthur M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P. Quantitative analysis of the metabolism of soluble cytoplasmic peptidoglycan precursors of glycopeptide-resistant enterococci. *Mol Microbiol* 1996; 21: 33-44.
9. Nicas TL. Novel vancomycin dimers with activity against vancomycin-resistant enterococci. *J Am Chem Soc* 1996; 118: 13107-8.
10. Xu R, Greiveldinger G, Marenus LE, Cooper A, Ellman JA. Combinatorial library approach for the identification of synthetic receptors targeting vancomycin-resistant bacteria. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 4898-9.
11. Ge M, Chen Z, Onishi HR, et al. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala. *Science* 1999; 284: 507-11.
12. Chiosis G, Boneca IG. Selective cleavage of D-Ala-D-Lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. *Science* 2001; 293: 1484-7.