

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



Université
de Paris



Inserm



PLASTICITÉ ADAPTATIVE DE LA CARBAPÉNÉMASE KPC

Congrès de la Ricai
13.12.2021

Gautier Pierrat

© RICAI 2021 Tous droits réservés

Sous la direction du Docteur Hervé Jacquier
Equipe QEM, UMR 1137

© RICAI 2021 Tous droits réservés

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : généralités

2

- KPC : bêta-lactamase de classe A (BLCA) de Ambler

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : généralités

- KPC : bêta-lactamase de classe A (BLCA) de Ambler
- 1^{ère} description de KPC-2 en 1996 en Caroline du Nord (Yigit *et al*, AAC, 2001)

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : généralités

4

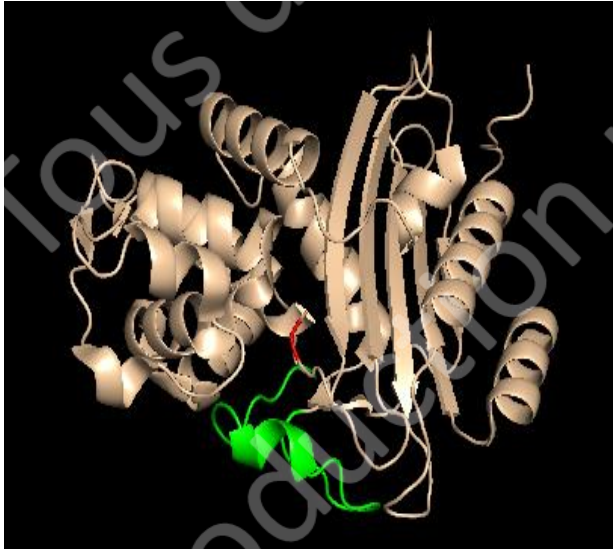
- KPC : bêta-lactamase de classe A (BLCA) de Ambler
- 1^{ère} description de KPC-2 en 1996 en Caroline du Nord (Yigit *et al*, AAC, 2001)
- Spectre de résistance de KPC-2 :
 - Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes
 - Inhibition partielle par le clavulanate et le tazobactam
 - Inhibition efficace par l'avibactam : efficacité de l'association ceftazidime-avibactam

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : généralités

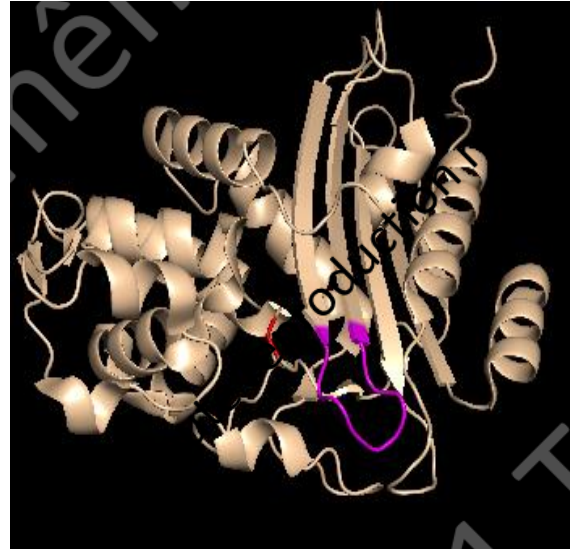
5

- KPC : bêta-lactamase de classe A (BLCA) de Ambler
- 1^{ère} description de KPC-2 en 1996 en Caroline du Nord (Yigit *et al*, AAC, 2001)
- Spectre de résistance de KPC-2 :
 - Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes
 - Inhibition partielle par le clavulanate et le tazobactam
 - Inhibition efficace par l'avibactam : efficacité de l'association ceftazidime-avibactam
- Variants de KPC associés à la résistance au ceftazidime-avibactam
 - Variants décrits *in vitro* et dans des isolats cliniques (n=50)
 - Présence de hotspots de mutations
 - Substitutions et insertions/délétions (indels) +++
 - Indels dans des isolats cliniques : 27/85, 31%

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : données structurales



- Boucle Omega
 - Insertions
 - Délétions
 - Substitutions



- Boucle 237-243
 - Délétions ++
 - Substitutions

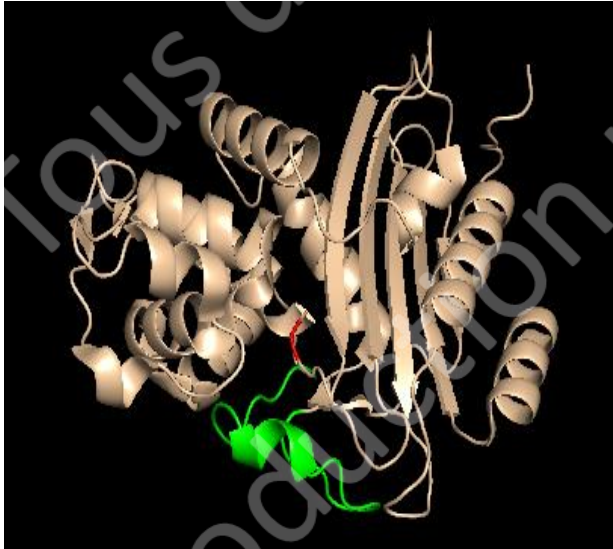


- Boucle 267-275
 - Distante du site actif
 - insertions ++

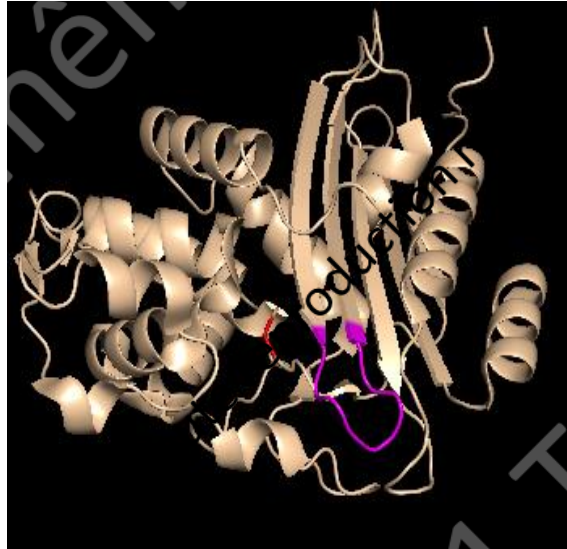
Commun BLCA

Propre à KPC

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : données structurales



- Boucle Omega
 - Insertions
 - Délétions
 - Substitutions



- Boucle 237-243
 - Délétions ++
 - Substitutions

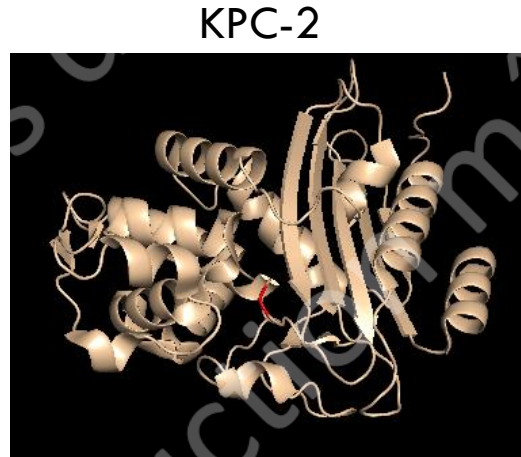


- Boucle 267-275
 - Distante du site actif
 - insertions ++

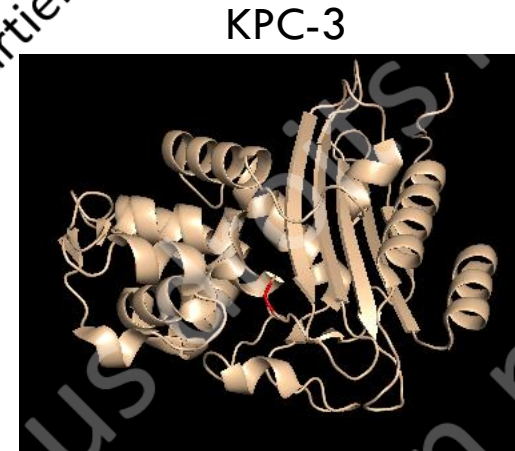
Commun BLCA

Propre à KPC

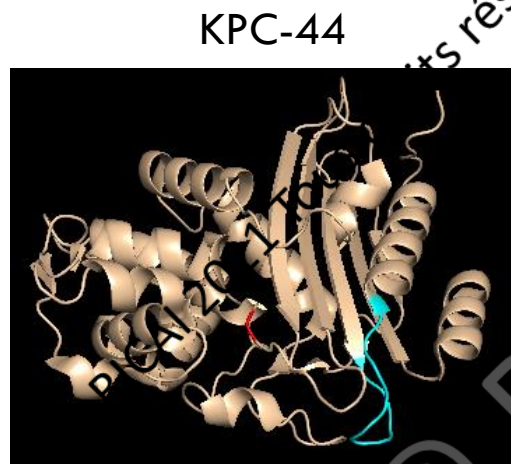
KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : données structurales



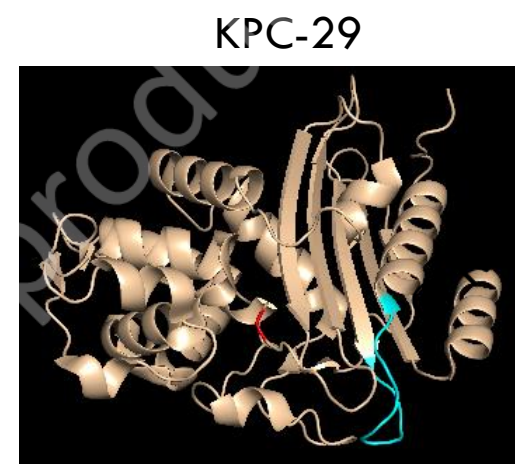
H274Y



ins261 AVYTRAPNKDDKHSSE



Ins269 KDD



Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Tous droits réservés. © 2021

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : un compromis évolutif ?

- Extension de spectre et compromis hydrolytique :
 - ▣ Résistance au ceftazidime/avibactam au détriment de la résistance aux carbapénèmes (Queslati et al. JAC, 2019)

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : un compromis évolutif ?

- Extension de spectre et compromis hydrolytique :
 - ▣ Résistance au ceftazidime/avibactam au détriment de la résistance aux carbapénèmes (Queslati et al. JAC, 2019)

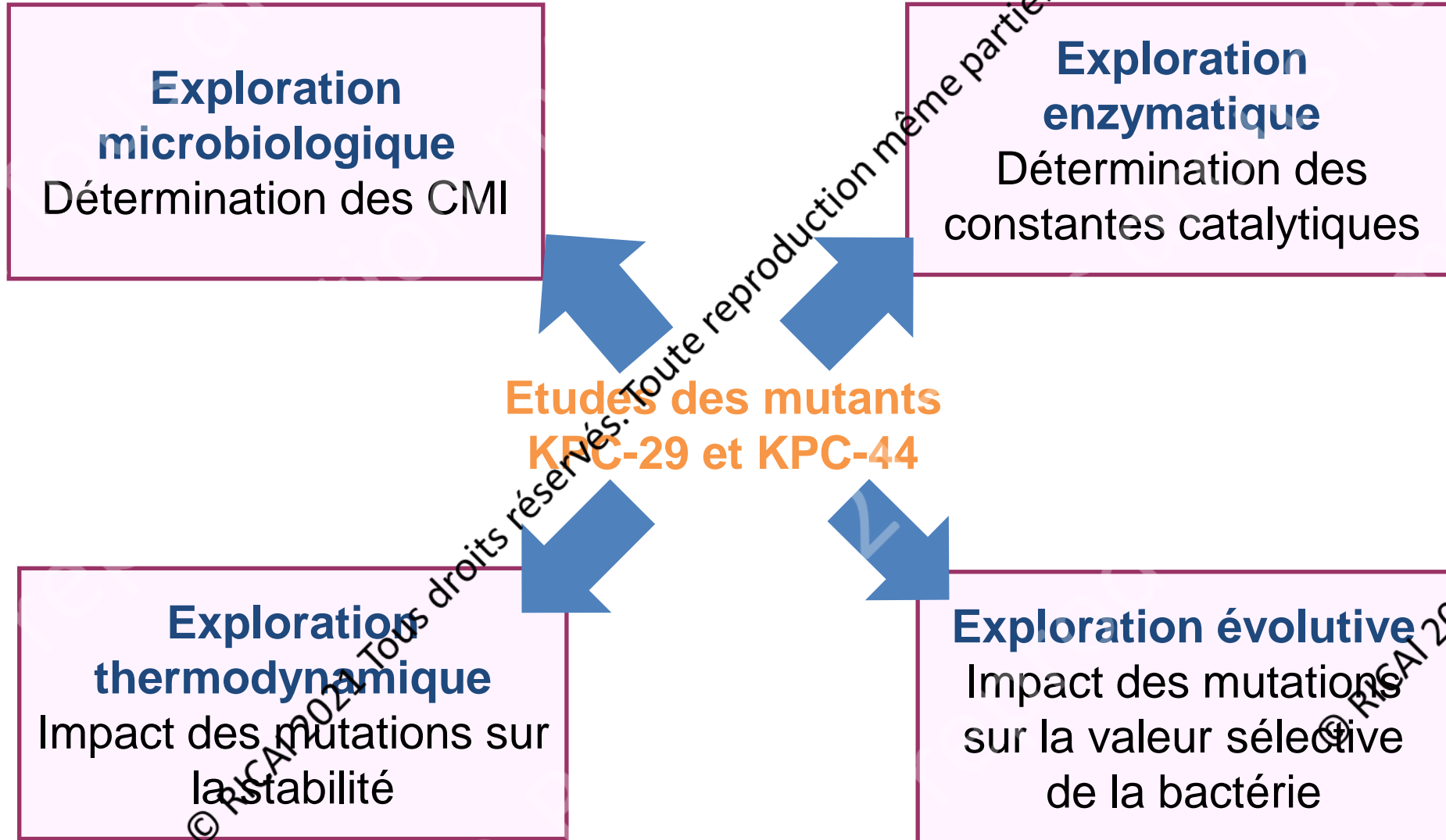
- Extension de spectre et stabilité
 - ▣ Acquisition d'une nouvelle fonction au détriment de la stabilité (Palzkill et al, Frontiers in Molecular Biosciences, 2018; Mehta et al, PLOS pathogens, 2015)

KPC et résistance au ceftazidime-avibactam : un compromis évolutif ?

- Extension de spectre et compromis hydrolytique :
 - ▣ Résistance au ceftazidime/avibactam au détriment de la résistance aux carbapénèmes (Queslati et al. JAC, 2019)

- Extension de spectre et stabilité
 - ▣ Acquisition d'une nouvelle fonction au détriment de la stabilité (Palzkill et al, Frontiers in Molecular Biosciences, 2018; Mehta et al, PLOS pathogens, 2015)
 - ▣ Stabilité plus importante de KPC vs autres BLCA (Palzkill et al, Frontiers in Molecular Biosciences, 2018)

Objectifs de l'étude



Objectifs de l'étude

**Exploration
microbiologique**
Détermination des CMI

**Exploration
enzymatique**
Détermination des
constantes catalytiques

**Etudes des mutants
KPC-29 et KPC-44**

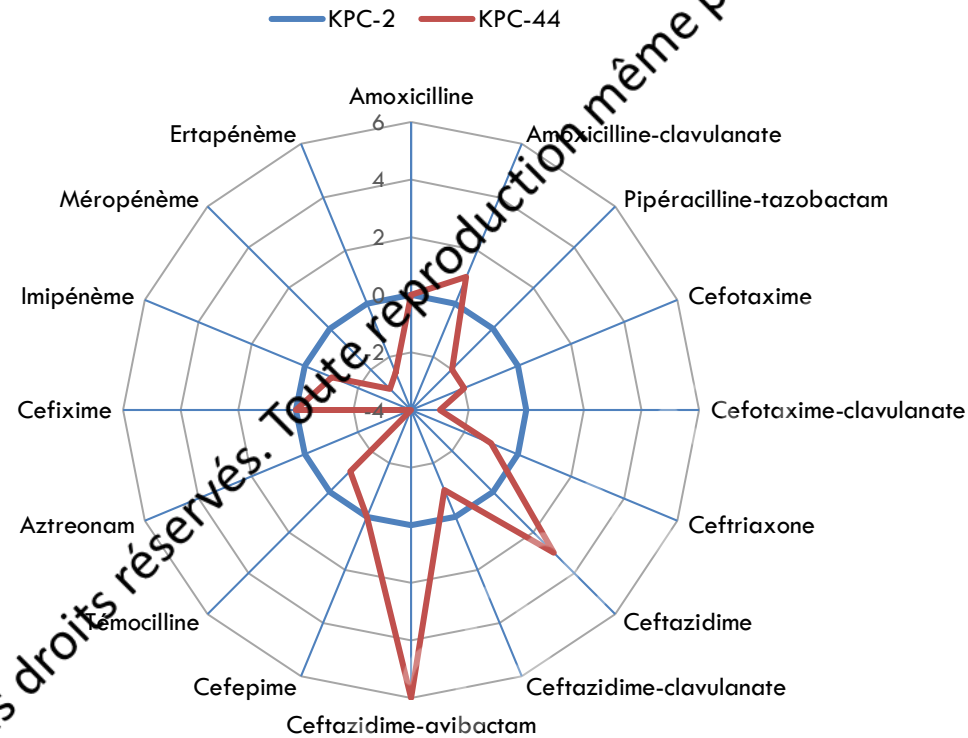
**Exploration
thermodynamique**
Impact des mutations sur
la stabilité

Exploration évolutive
Impact des mutations
sur la valeur sélective
de la bactérie

Détermination des CMI

KPC-44 vs KPC-2

Ratio des Log₂(CMI) de KPC-2 et KPC-44

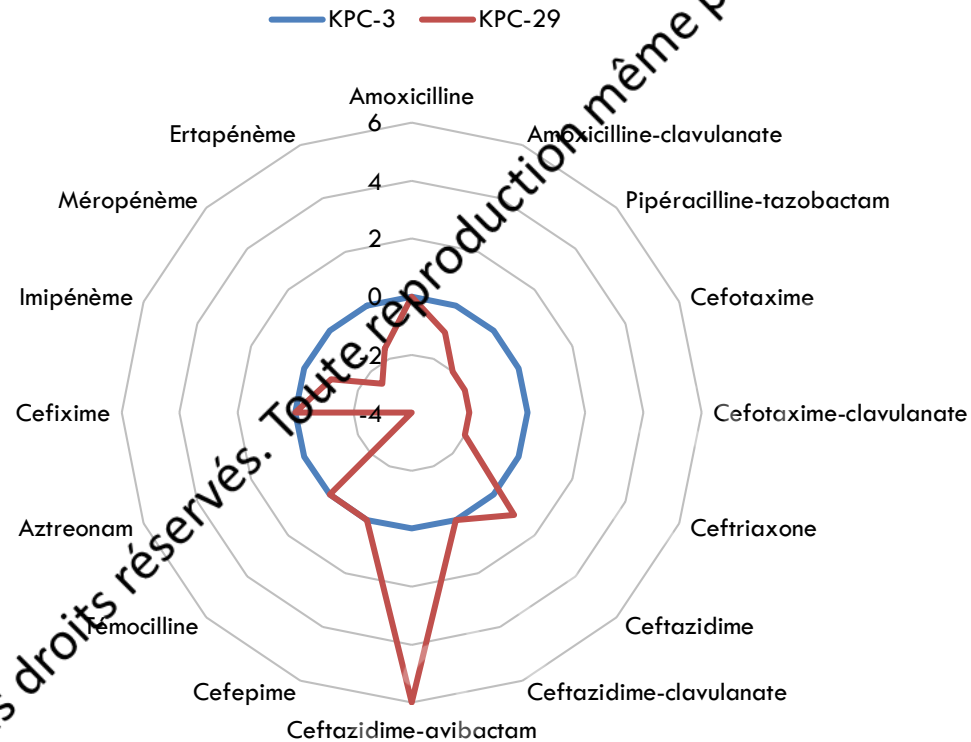


- Augmentation des CMI de la ceftazidime et du ceftazidime/avibactam
- Diminution des CMI des carbapénèmes

Détermination des CMI

KPC-29 vs KPC-3

Ratio des Log₂(CMI) de KPC-3 et KPC-29



- Augmentation des CMI de la ceftazidime et du ceftazidime/avibactam
- Diminution des CMI des carbapénèmes

Objectifs de l'étude

Exploration
microbiologique
Détermination des CMI

**Exploration
enzymatique**
Détermination des
constantes catalytiques

**Etudes des mutants
KPC-29 et KPC-44**

Exploration
thermodynamique
Impact des mutations sur
la stabilité

Exploration évolutive
Impact des mutations
sur la valeur sélective
de *E. coli*

Détermination des paramètres cinétiques carbapénèmes

17

	Km (μM)		kcat(s ⁻¹)		kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	KPC-2	KPC-44	KPC-2	KPC-44	KPC-2	KPC-44
Imipénème	209	100	27		130	70
Ertapénème	212	79	3,7	0,02	17	0,3
Méropénème	67	80	0,8	0,03	12	0,4

	Km (μM)		kcat(s ⁻¹)		kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	KPC-3	KPC-29	KPC-3	KPC-29	KPC-3	KPC-29
Imipénème	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours
Ertapénème	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours
Méropénème	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours	en cours

- Pour KPC-44, la baisse des CMI des carbapénèmes est associée à une baisse de l'activité catalytique

Détermination des paramètres cinétiques ceftazidime

18

	Km (μM)		kcat(s-1)		kcat/Km ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	KPC-2	KPC-44	KPC-2	KPC-44	KPC-2	KPC-44
Ceftazidime	>1000	>1000	>1,15	>2,98	1	3

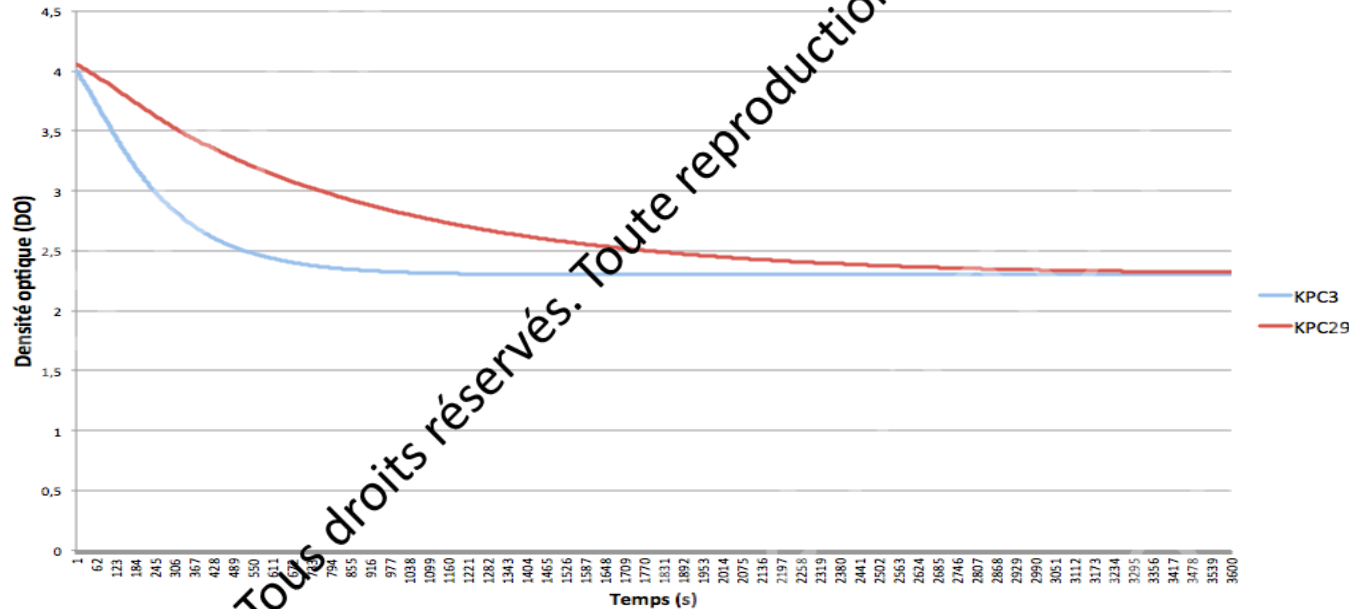
	Km (μM)		kcat(s-1)		kcat/Km ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	KPC-3	KPC-29	KPC-3	KPC-29	KPC-3	KPC-29
Ceftazidime	>2000	>2000	>15,3	>9,47	8	5

- Pas d'association claire entre l'efficacité catalytique et l'augmentation des CMI
- Nécessité d'autres approches pour explorer le mécanisme catalytique en jeu

Mesure de l'hydrolyse de la ceftazidime

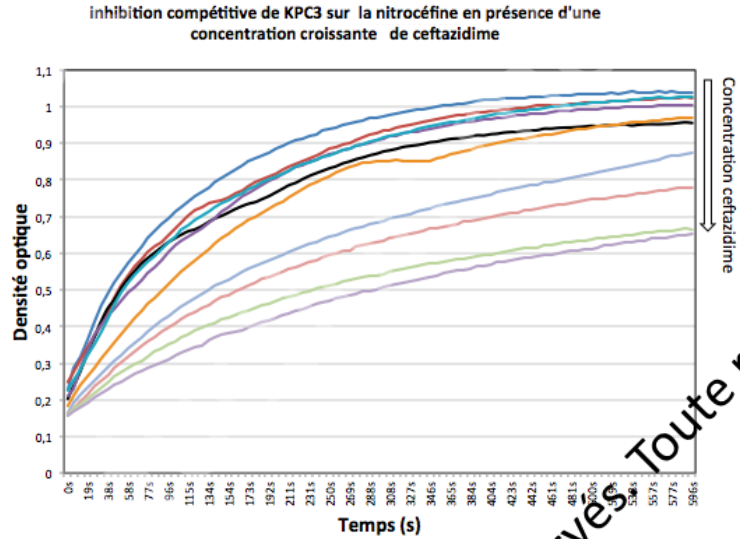
19

Mesure de l'hydrolyse de ceftazidime (25 μM) en présence de KPC-3 ou KPC-29 (1 μM)



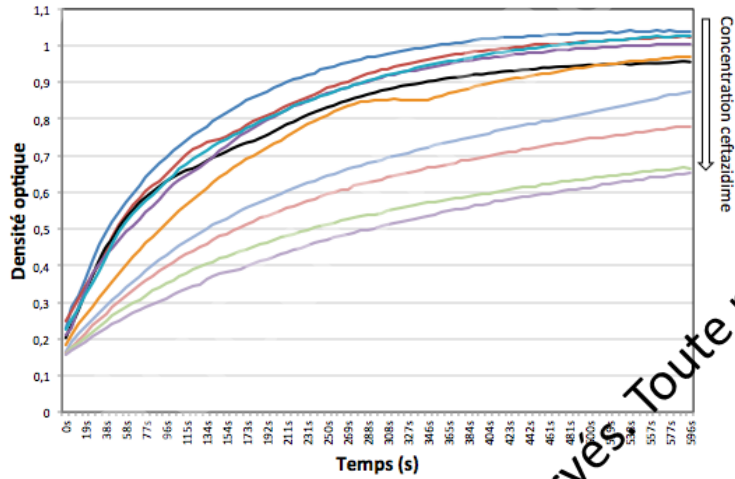
- Hydrolyse plus lente de la ceftazidime avec KPC-29

Inhibition compétitive ceftazidime/nitrocéfine

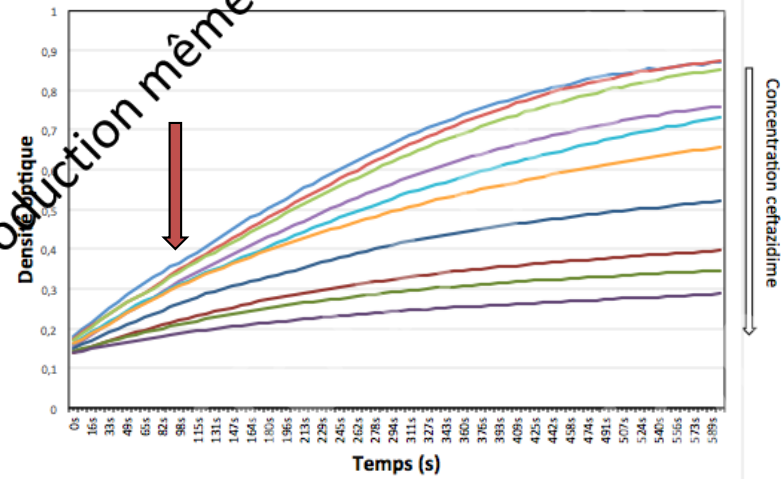


Inhibition compétitive ceftazidime/nitrocéfine

Inhibition compétitive de KPC3 sur la nitrocéfine en présence d'une concentration croissante de ceftazidime

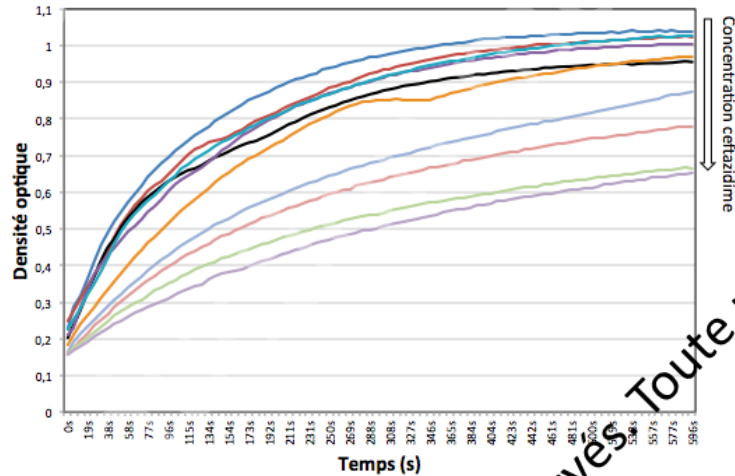


Inhibition compétitive de KPC29 sur la nitrocéfine en présence d'une concentration croissante de ceftazidime

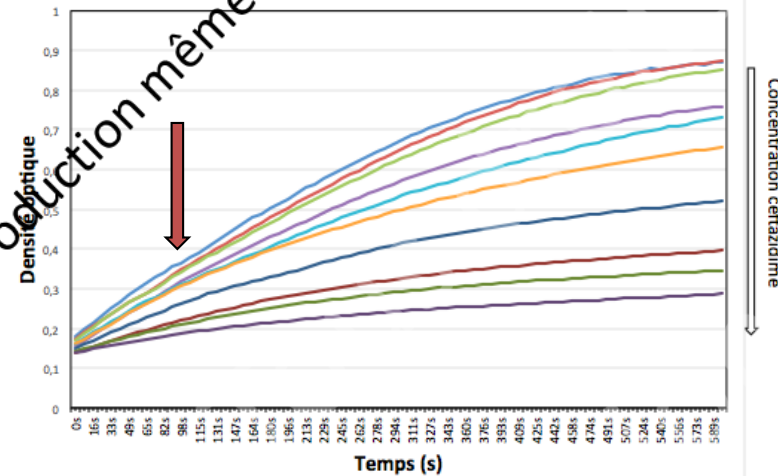


Inhibition compétitive ceftazidime/nitrocéfine

inhibition compétitive de KPC3 sur la nitrocéfine en présence d'une concentration croissante de ceftazidime

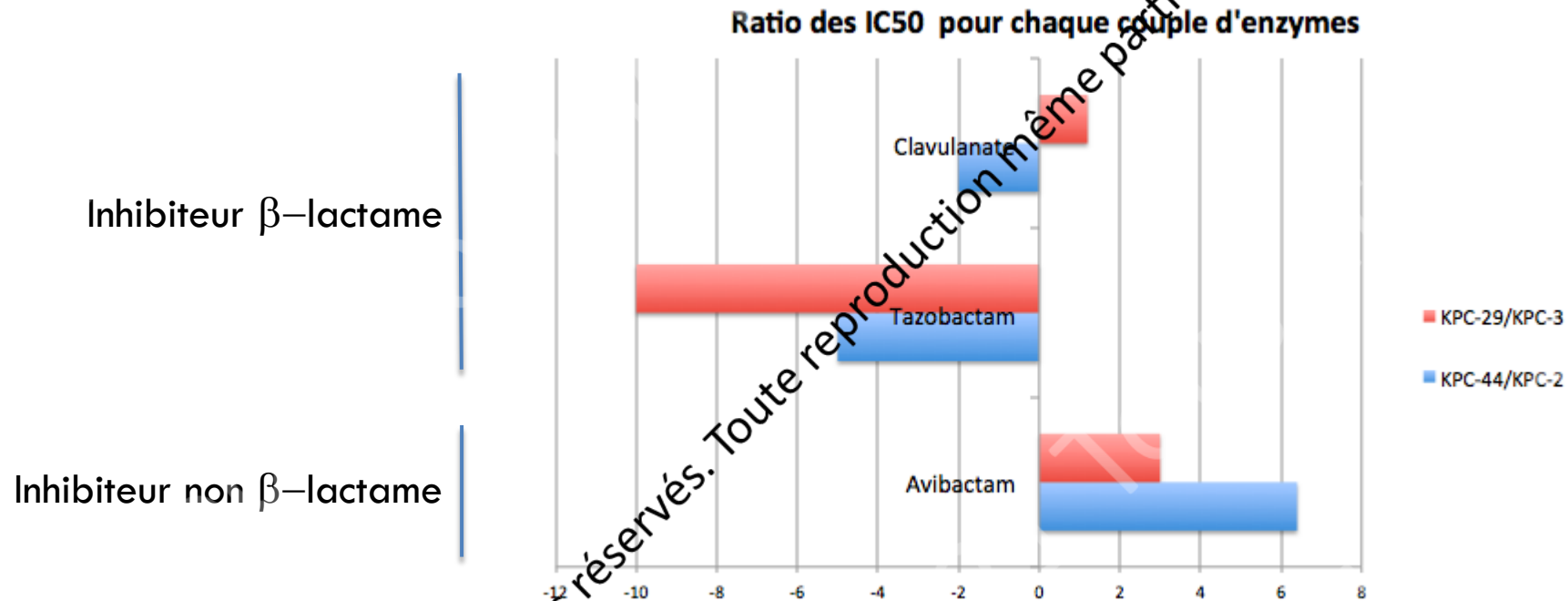


Inhibition compétitive de KPC29 sur la nitrocéfine en présence d'une concentration croissante de ceftazidime



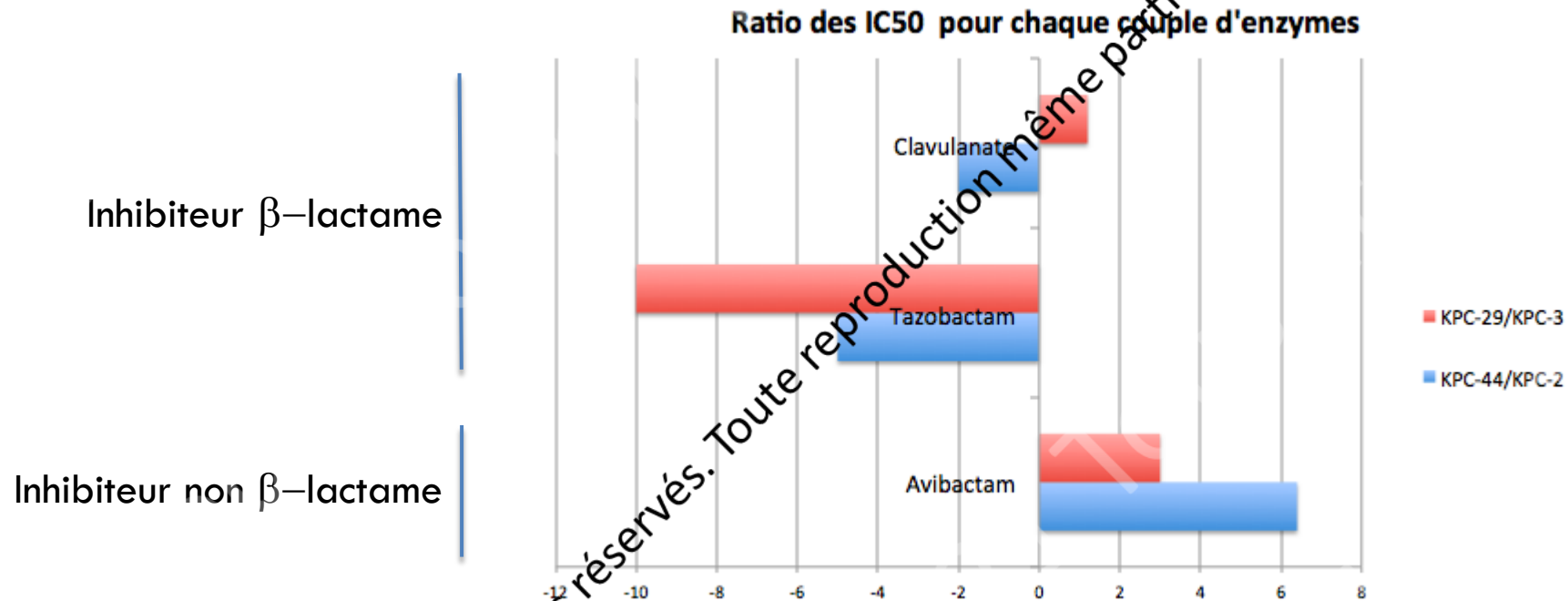
- La ceftazidime exerce une inhibition plus importante vis-à-vis de KPC-29 que de KPC-3
- Liaison plus importante de la ceftazidime au site actif de KPC-29, mais avec une activité catalytique plus faible ?

Détermination de l'activité inhibitrice du clavulanate, du tazobactam et de l'avibactam



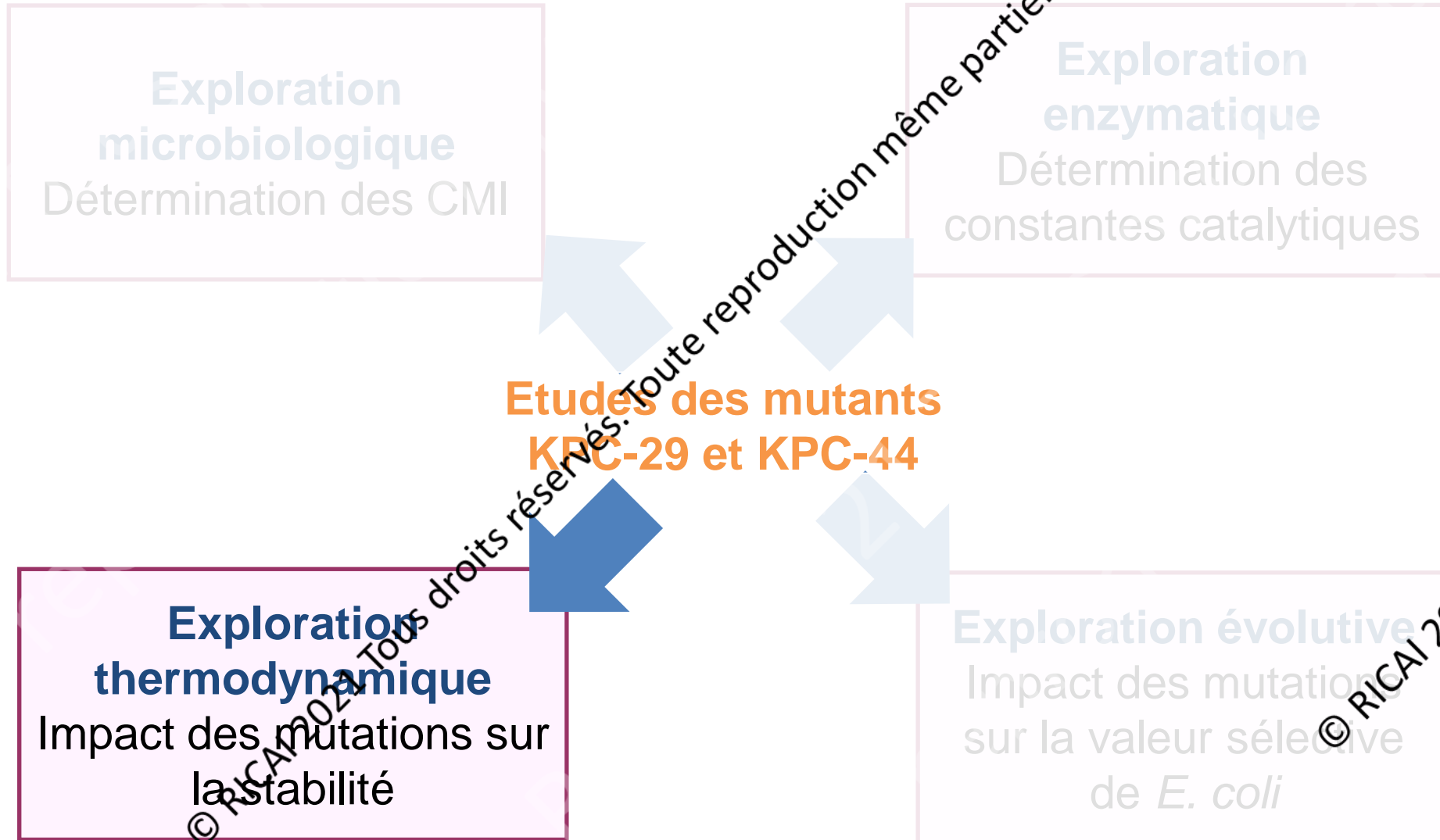
- Détermination des IC50: mesure de l'hydrolyse de la nitrocéfine (486 nm) en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs

Détermination de l'activité inhibitrice du clavulanate, du tazobactam et de l'avibactam



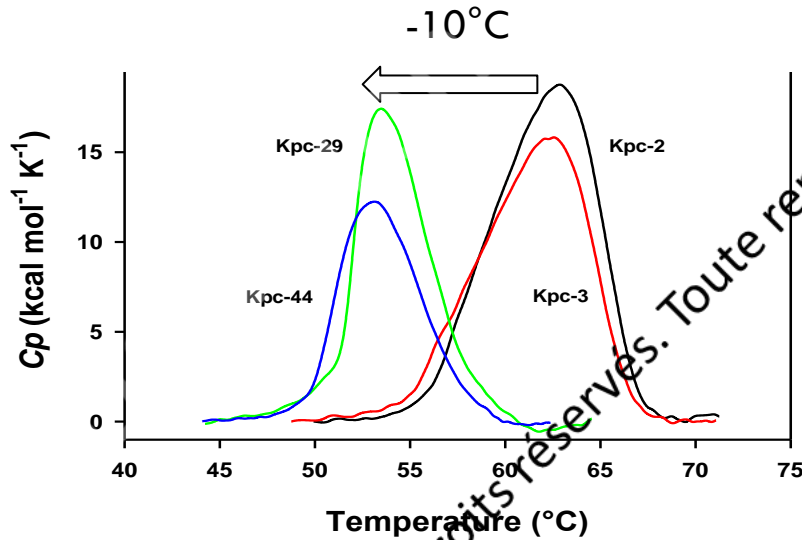
- Détermination des IC50: mesure de l'hydrolyse de la nitrocéfine (486 nm) en présence de concentrations croissantes d'inhibiteurs
- Réduction des IC50 au tazobactam
- Augmentation des IC50 à l'avibactam
- Corroborent les résultats mis en évidence par les CMI

Objectifs de l'étude



Exploration thermodynamique de l'impact des insertions dans KPC-2 et KPC-3

- Détermination de l'impact des insertions sur la stabilité de KPC-2 et KPC-3 par microcalorimétrie

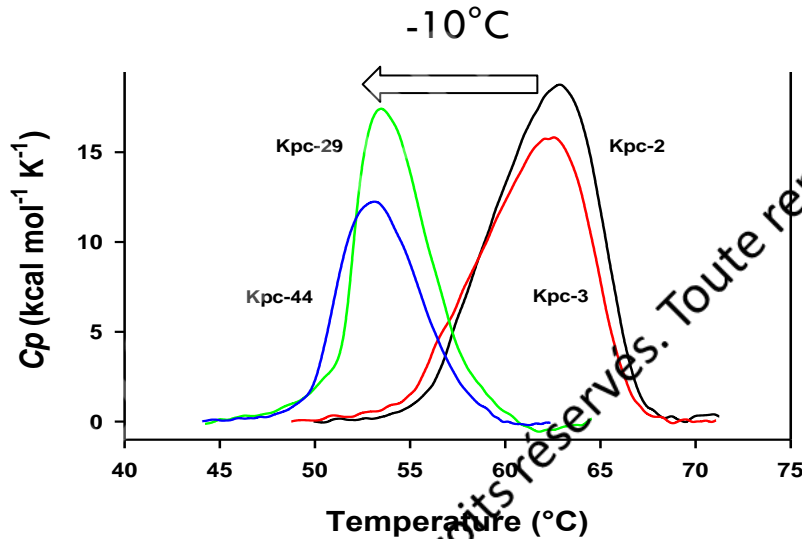


Protéine	T_m $^{\circ}\text{C}$
KPC-2	63.0
KPC-3	62.8
KPC-29	53.8
KPC-44	53.4

Exploration thermodynamique de l'impact des insertions dans KPC-2 et KPC-3

27

- Détermination de l'impact des insertions sur la stabilité de KPC-2 et KPC-3 par microcalorimétrie



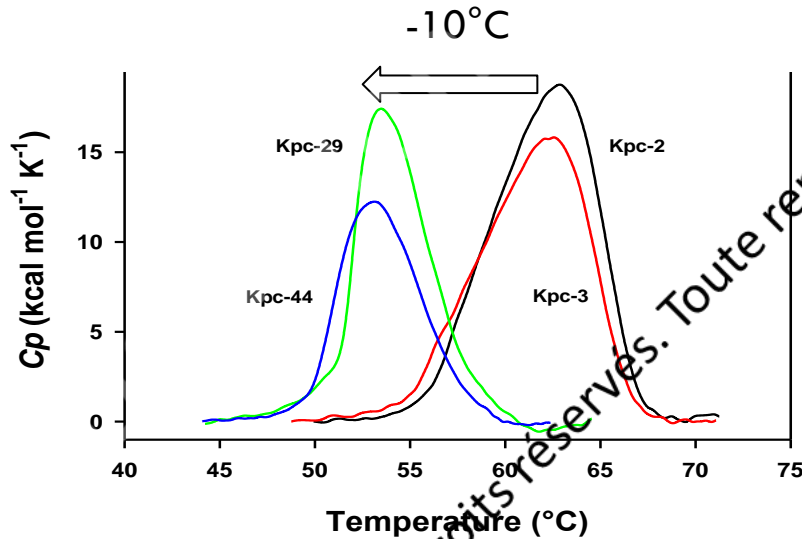
Protéine	T_m $^{\circ}\text{C}$
KPC-2	63.0
KPC-3	62.8
KPC-29	53.8
KPC-44	53.4

- Baisse de stabilité importante des variants dans les mêmes proportions

Exploration thermodynamique de l'impact des insertions dans KPC-2 et KPC-3

28

- Détermination de l'impact des insertions sur la stabilité de KPC-2 et KPC-3 par microcalorimétrie



Protéine	T_m $^{\circ}\text{C}$
KPC-2	63.0
KPC-3	62.8
KPC-29	53.8
KPC-44	53.4

- Baisse de stabilité importante des variants dans les mêmes proportions
- Stabilité relative encore élevée : impact sur la valeur sélective chez *E. coli* à 37°C ?

Objectifs de l'étude

Exploration
microbiologique
Détermination des CMI

Exploration
enzymatique
Détermination des
constantes catalytiques

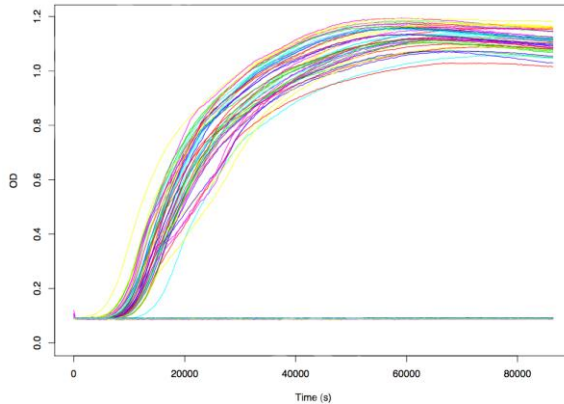
Etudes des mutants
KPC-29 et KPC-44

Exploration
thermodynamique
Impact des mutations sur
la stabilité

Exploration évolutive
Impact des mutations
sur la valeur sélective
de *E. coli*

Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (courbe de croissance)

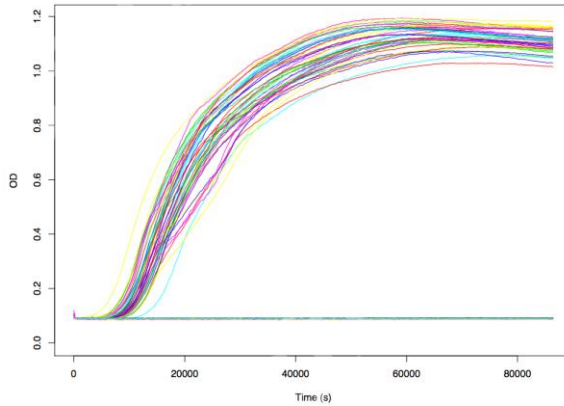
30



- Courbes de croissance de souches de *E. coli* K12 pBR-*bla*_{KPC} réalisées en LB+tétracycline en microplaque sur le lecteur Tecan

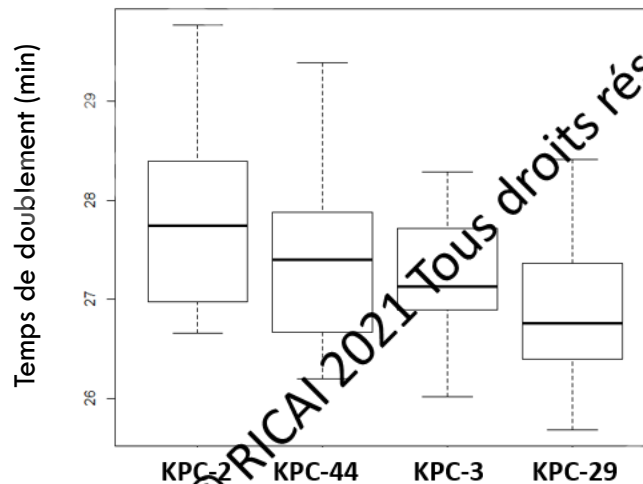
Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (courbe de croissance)

31



P=0,24

P=0,34

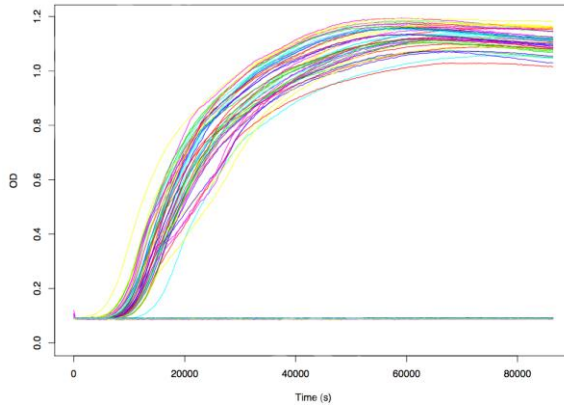


- Courbes de croissance de souches de *E. coli* K12 pBR-*bla*_{KPC} réalisées en LB+tétracycline en microplaque sur le lecteur Tecan

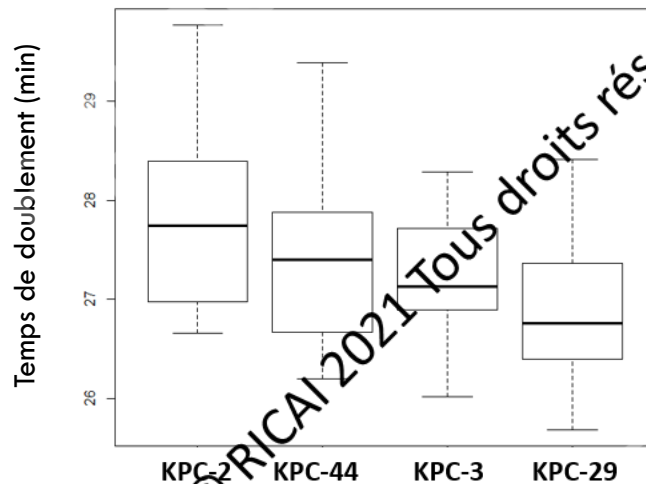
- Pas d'impact des mutations sur la fitness...

Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (courbe de croissance)

32



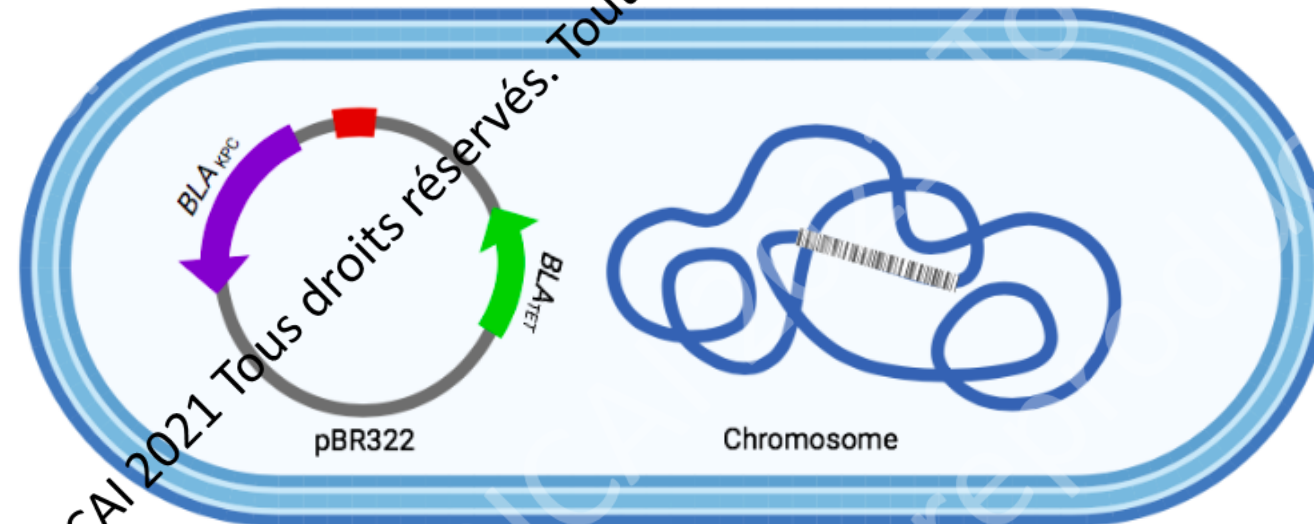
- Courbes de croissance de souches de *E. coli* K12 pBR-*bla*_{KPC} réalisées en LB+tétracycline en microplaque sur le lecteur Tecan



- Pas d'impact des mutations sur la fitness...
- ... mais méthode peu discriminante pour les effets faibles

Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (compétitions)

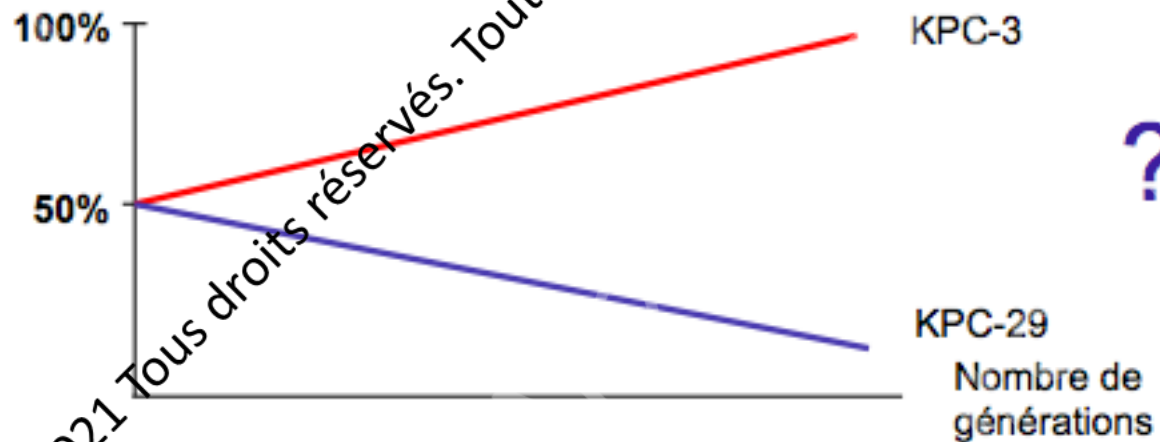
- 1^{ère} étape: intégration de codes à barre au sein du chromosome de *E. coli* K12 pBR-*bla*_{KPC} par Lambda-Red / CRISPR-cas9



E. Coli K12

Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (compétitions)

- 2^{ème} étape: mise en compétition mutant vs ancêtre en eVOLVER (système de turbidostat automatisé)



Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (compétitions)

- 3^{ème} étape : séquençage des barres-codes à différents points de temps pour déterminer la fréquence relative de chacun des allèles mutants vs ancêtres



Impact des mutations sur la fitness de *E. coli* (compétitions)

- ✓ 1^{ère} étape: intégration de codes à barres au sein du chromosome de *E. coli* K12 pBR- ϕ _{KPC} par Lambda-Red / CRISPR-cas9
- ✓ 2^{ème} étape: mise en compétition mutant vs ancêtre en eVOLVER (système de turbidostat automatisé)
- ✗ 3^{ème} étape : séquençage des barres-codes à différents points de temps pour déterminer la fréquence relative de chacun des allèles mutants vs ancêtres

Conclusion

□ Compromis enzymologique :

▣ CMI carbapénème diminuée

- Baisse de l'activité catalytique

▣ CMI ceftazidime augmentée

- Activité catalytique identique

- Plus forte liaison sans hydrolyse efficace (Mueller *et al*, AAC, 2019; Poirel *et al*, AAC, 2020)

▣ CMI ceftazidime/avibactam augmentée

- IC50 avibactam augmentée

Conclusion

38

- Compromis thermodynamique :
 - ▣ KPC-29 et KPC-44 moins stable
 - Réduction des valeurs de T_m de près de 10°C
 - Perte de stabilité plus importante que pour substitutions (Mehta *et al.* PLOS pathogens, 2015)
 - ▣ Les variants de KPC restent cependant plus stable que BLCA (Palzkill *et al.*, Frontiers in Molecular Biosciences, 2018)
- Proportion importante d'insertions/délétions de KPC dû à une forte stabilité ?

Conclusion et perspectives

- Compromis évolutif ?
- Quel impact sur la capacité sélective des bactéries porteuses ?
 - ▣ Pas d'impact au niveau des courbes de croissance
 - ▣ Intérêt de l'étude sur eVOLVER

IAME : UMR 1137

Equipe QEM

Olivier Tenailon

Antoine Bridier Nahmias

Imane El Meouche

Melanie Magnan

André Birgy

Hervé Jacquier

Mathilde Lescat

Alaksh Choudhury

Zoya Dixit

François Blanquart

Thibault Corneloup

Claire Hobson

**Ecole Polytechnique
Laboratoire de biochimie**

Yves Mechulam

Emmanuelle Schmitt

Christine Lazennec

**Centre Ingénierie
des Protéines**

Moreno Galleni

Frederic Kerff

Fabrice Bouillenne

Paola Mercuri



© RICAI 2021 Tous droits réservés