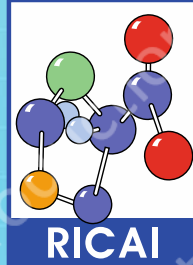


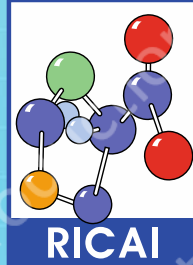
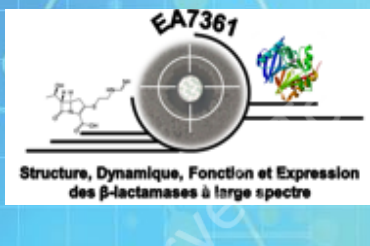
36^{ème} Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Lundi 12 et mardi 13 décembre 2016
Palais des Congrès de Paris



Caractérisation de promoteurs et expression du gène *bla*_{KPC-2}

Delphine Girlich, Rémy A. Bonnin, Agnès Jousset, Thierry Naas

EA7361, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France



Introduction

KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase
class A, serine β -lactamase

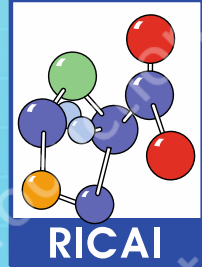
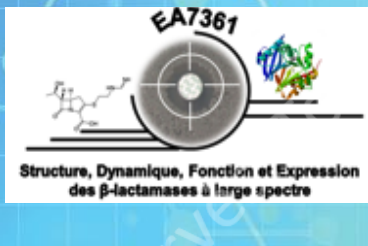
identification initiale dans *K. pneumoniae* 2001 en Caroline du Nord (Yigit et al. AAC)

hydrolyse les différentes classes de β -lactamines dont les carbapénèmes

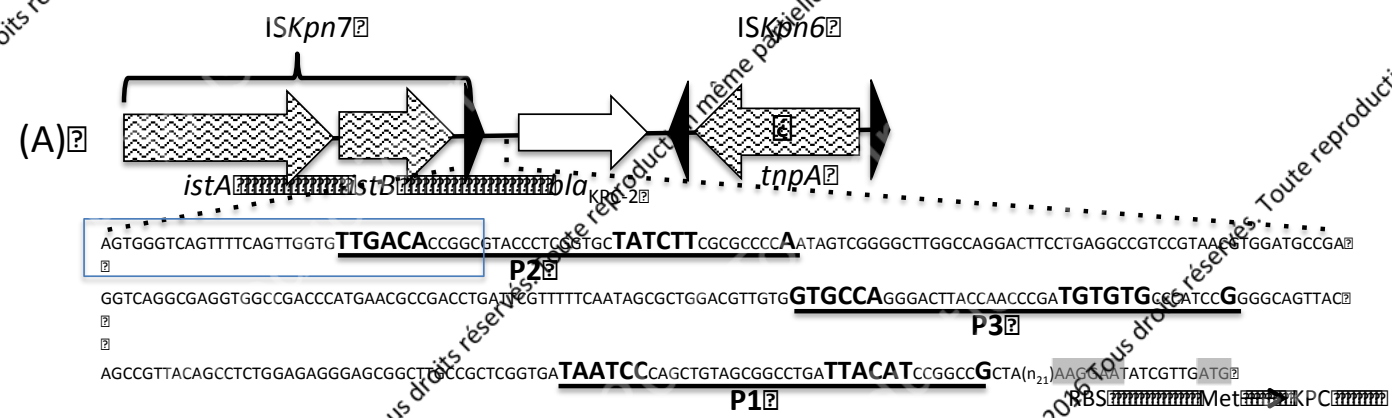
bla_{KPC} détecté dans différentes Enterobacteriaceae
dissémination mondiale
endémique aux USA chez *K. pneumoniae*

bla_{KPC} dans *Pseudomonas aeruginosa* initialement Colombie en 2007 (Villegas et al. AAC)

bla_{KPC} dans *Acinetobacter baumannii* initialement Puerto Rico en 2009 (Martinez et al. AAC)

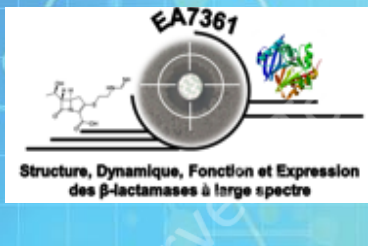


Les gènes *bla*_{KPC}, localisés sur des plasmides ou dans le chromosome Tn4401, famille transposon Tn3



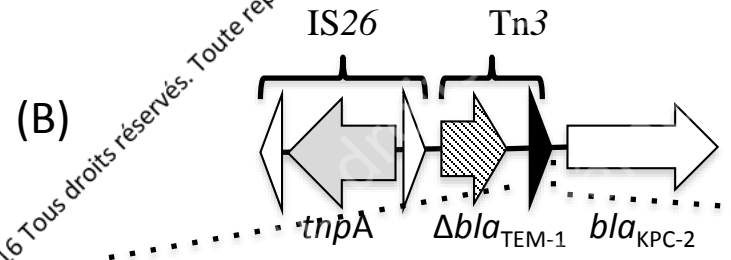
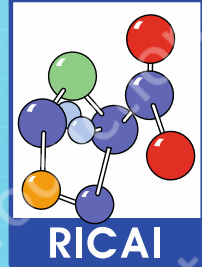
- Largement identifiée chez Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*
- Forme tronquée uniquement P2 présent chez *A. baumannii*

(Yigit et al. AAC 2001; Roth et al. 2011; Naas et al. AAC 2012)



36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

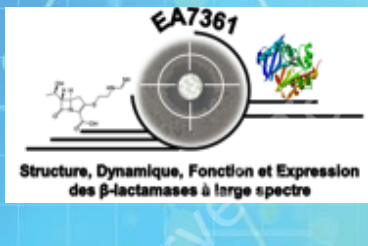
Lundi 12 et mardi 13 décembre 2016
Palais des Congrès de Paris



TAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA

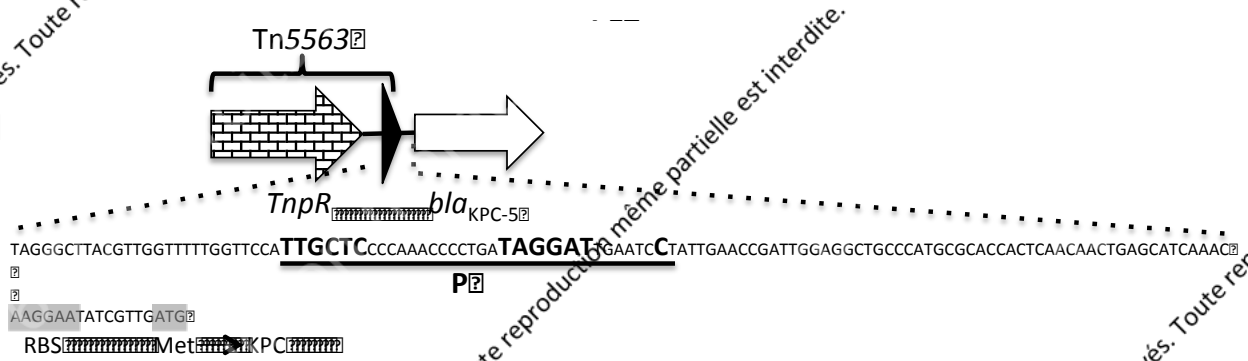
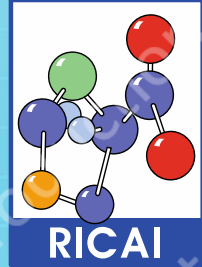
TCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCC **TAATCC** CCGCTGAGCGGCCTGA **TTACAT** CCGGCCGCTA(n₂₁) **AAGGAATATCGTTGATG**
P1 RBS Met → KPC

- Identifiée chez *P. aeruginosa* PA-2, Colombie (Wass et al. AAC 2013)



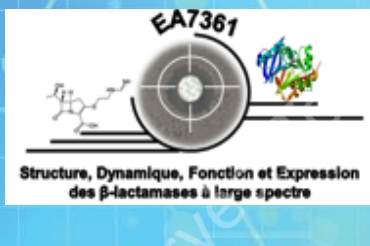
36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Lundi 12 et mardi 13 décembre 2016
Palais des Congrès de Paris

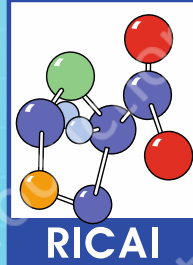


- Identifiée chez *P. aeruginosa* bla_{KPC-5}, Puerto-Rico (Wolter et al. AAC 2009)

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



36^{ème} Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Lundi 12 et mardi 13 décembre 2016
Palais des Congrès de Paris



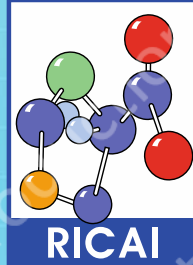
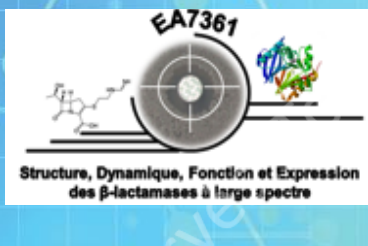
Objectifs

Identifier le promoteur utilisé dans ces 3 différentes structures pour l'expression de KPC dans les 3 espèces: *E. coli*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

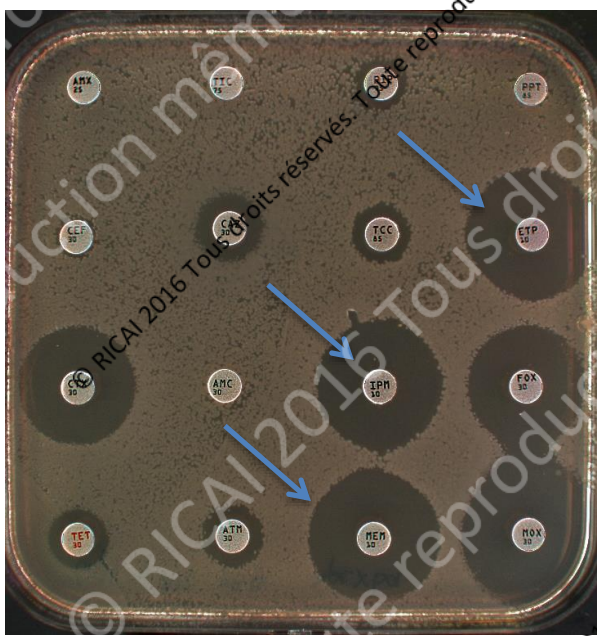


Méthodes

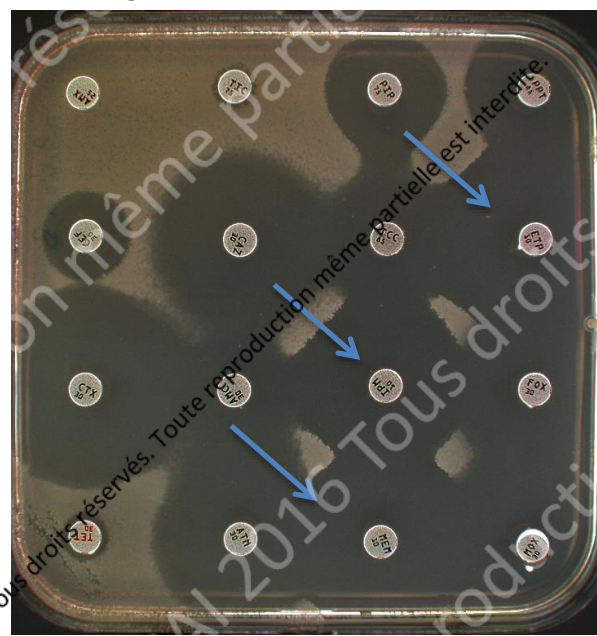
- PCR du gène *bla*_{KPC-2} et des 3 séquences localisées en amont de *bla*_{KPC-2}
- clonage dans un plasmide se répliquant chez *E. coli* (TOP10) et *P. aeruginosa* (KG2505): *pBBR1MCS.3*
- *E. coli* (TOP10) et *A. baumannii* (CIP 70.10): *pIMarr-2*
- CMI (E-test)
- qRT-PCR
- 5'RACE (Invitrogen)
- Activité spécifique, hydrolyse de l'imipénème

Résultats

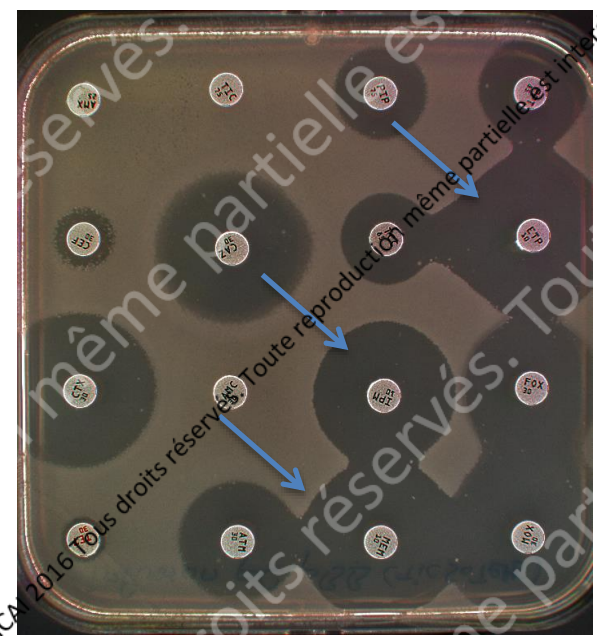
Expression bla_{KPC-2} dans *E. coli* TOP10 (pBBR1MCS.3)



A
Tn4401b : P1 + P2 + P3

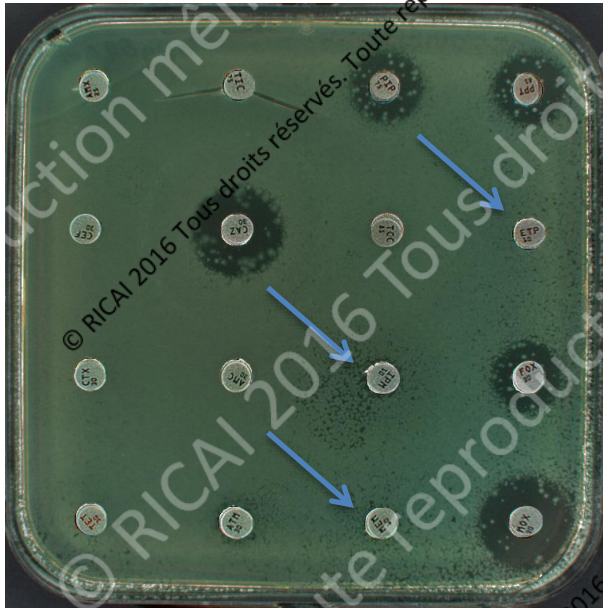


B
 Δ Tn3 P1 + IS26

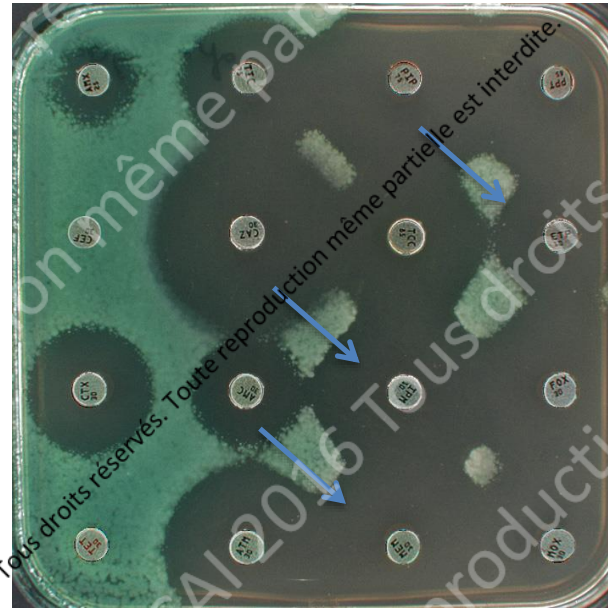


C
Tn5563 : P

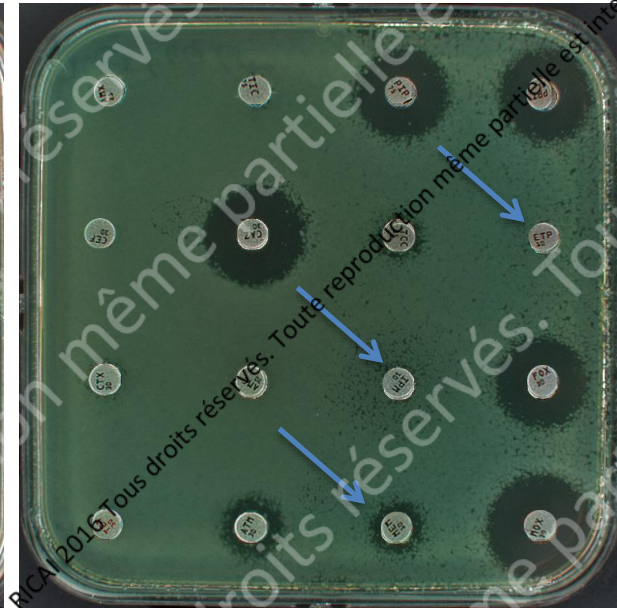
Expression *bla*_{PC-2} dans *P. aeruginosa* KG2505(pBBR1MCS.3)



A
Tn4401b : P1 + P2 + P3

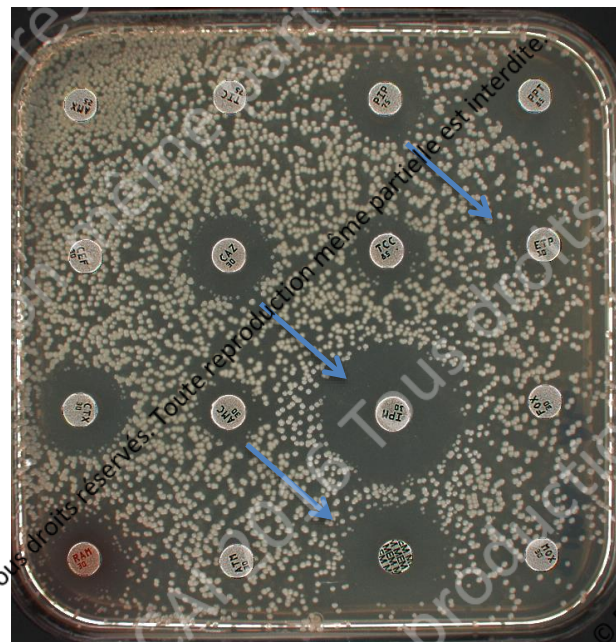


B
 Δ Tn3 P1 + IS26



C
Tn5563 : P

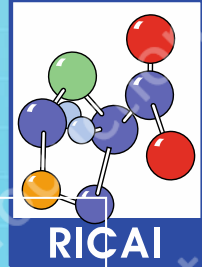
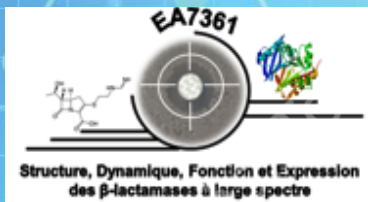
Expression de *bla*_{KPC-2} dans *A. baumannii* CIP70.10 (pIMarr-2)



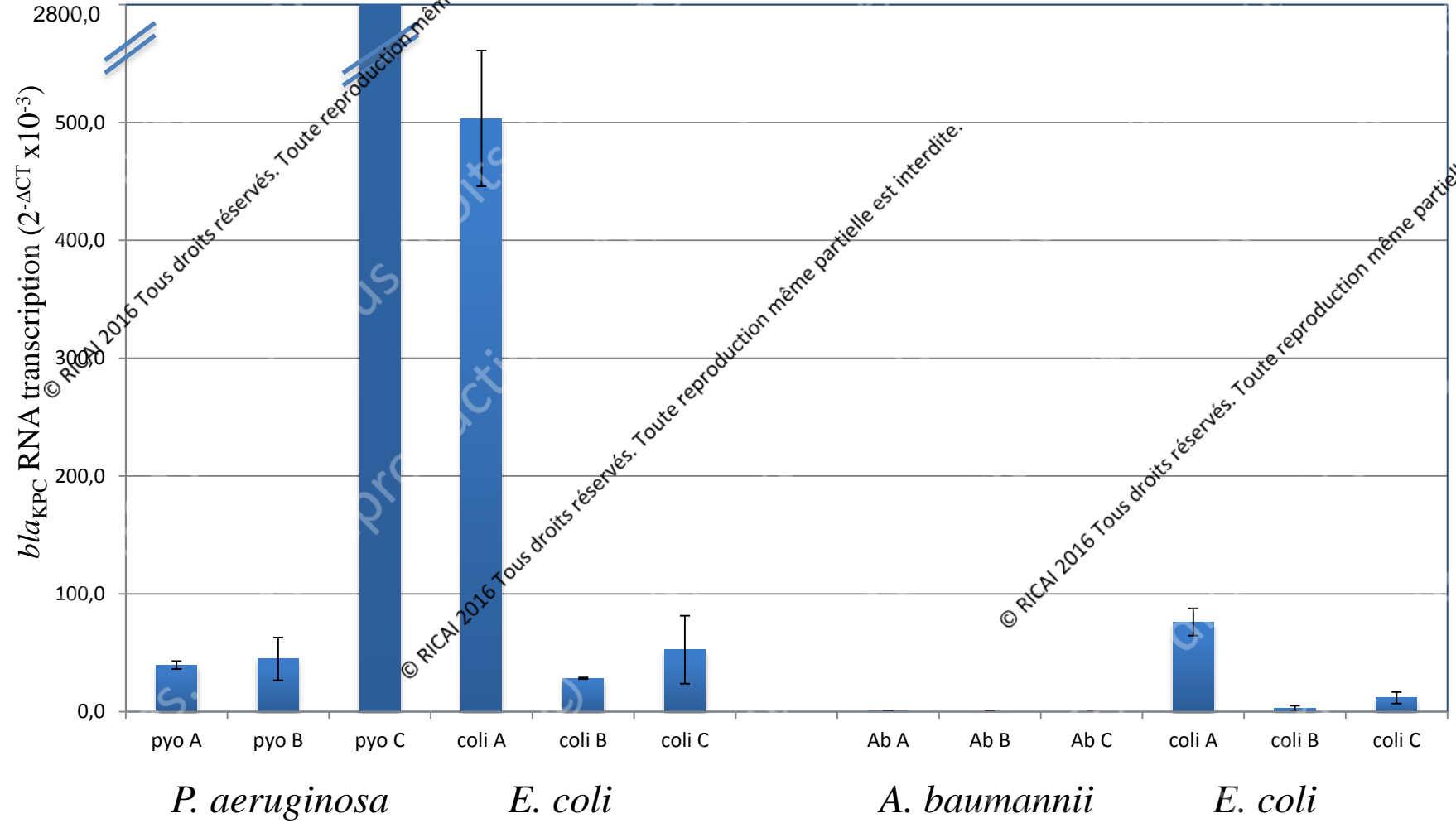
A
Tn4401b : P1 + P2 + P3

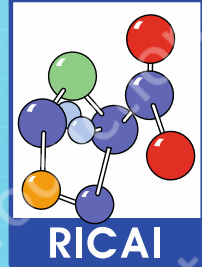
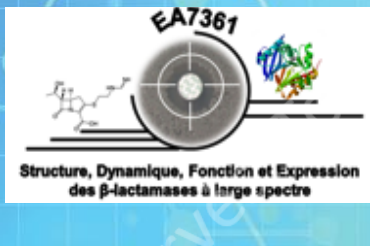
B
 Δ Tn3 P1 + IS26

C
Tn5563 : P

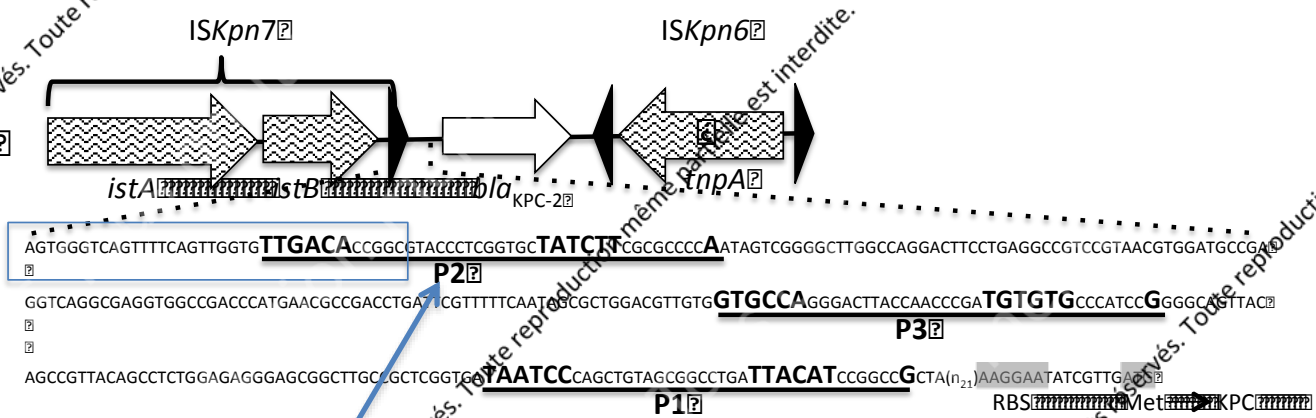


Transcription de *bla*_{KPC-2}





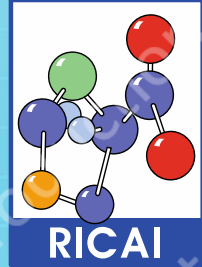
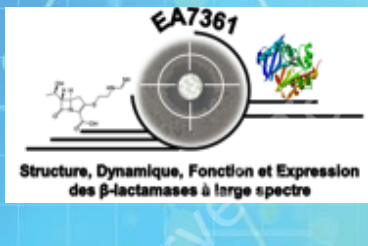
Caractérisation des promoteurs Structure A



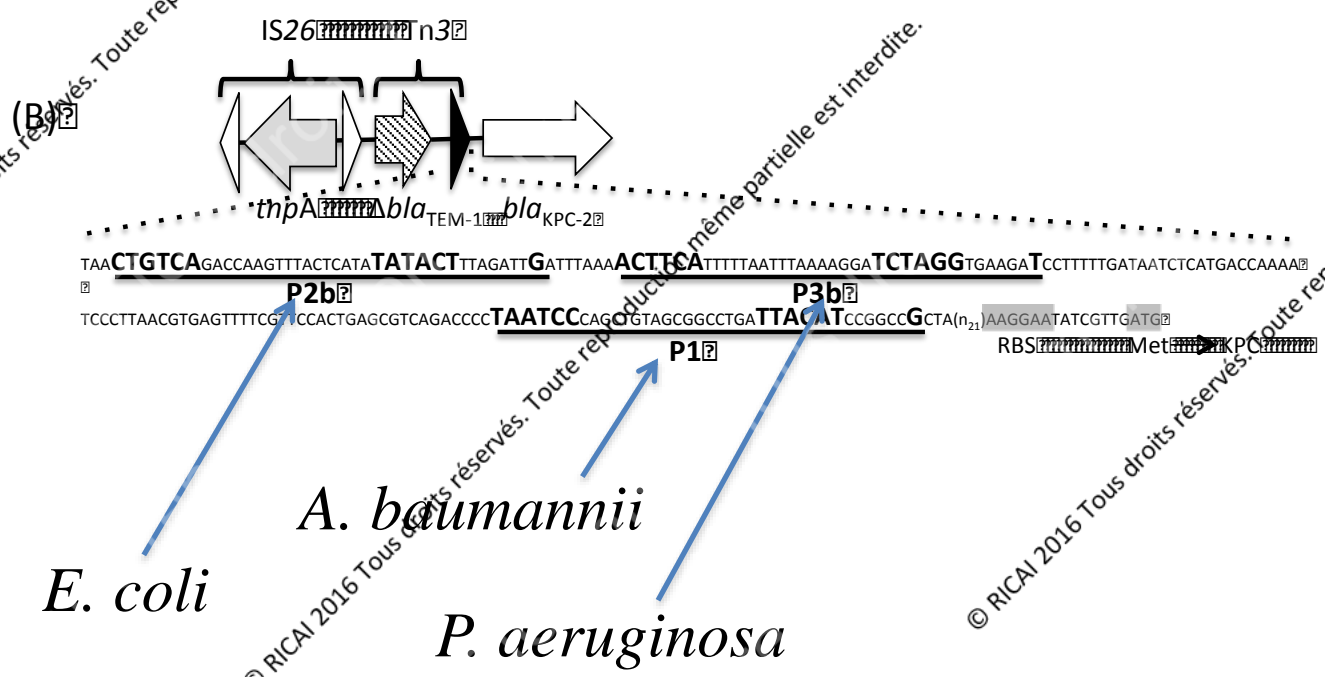
E. coli et *A. baumannii*

P. aeruginosa

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



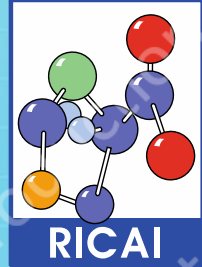
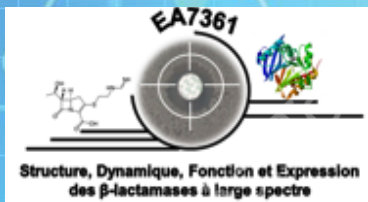
Caractérisation des promoteurs Structure B



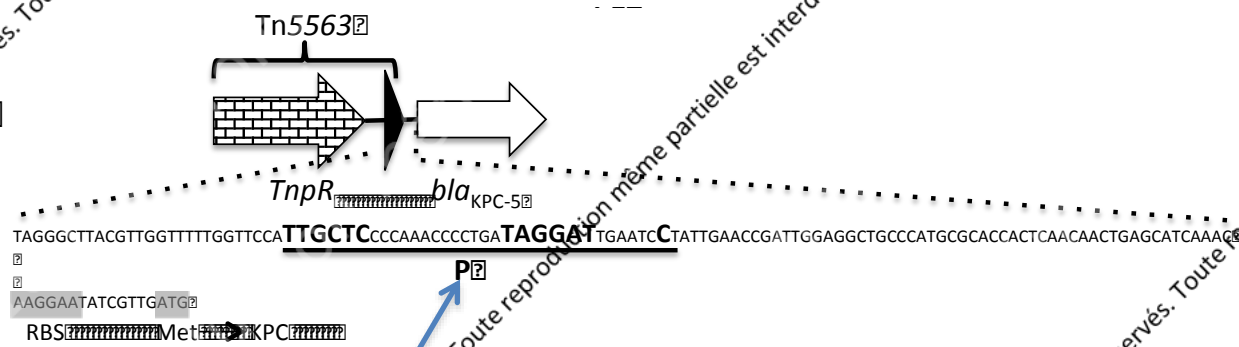
© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

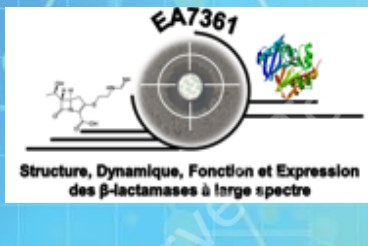


Caractérisation des promoteurs Structure C

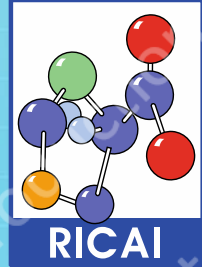


E. coli, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*

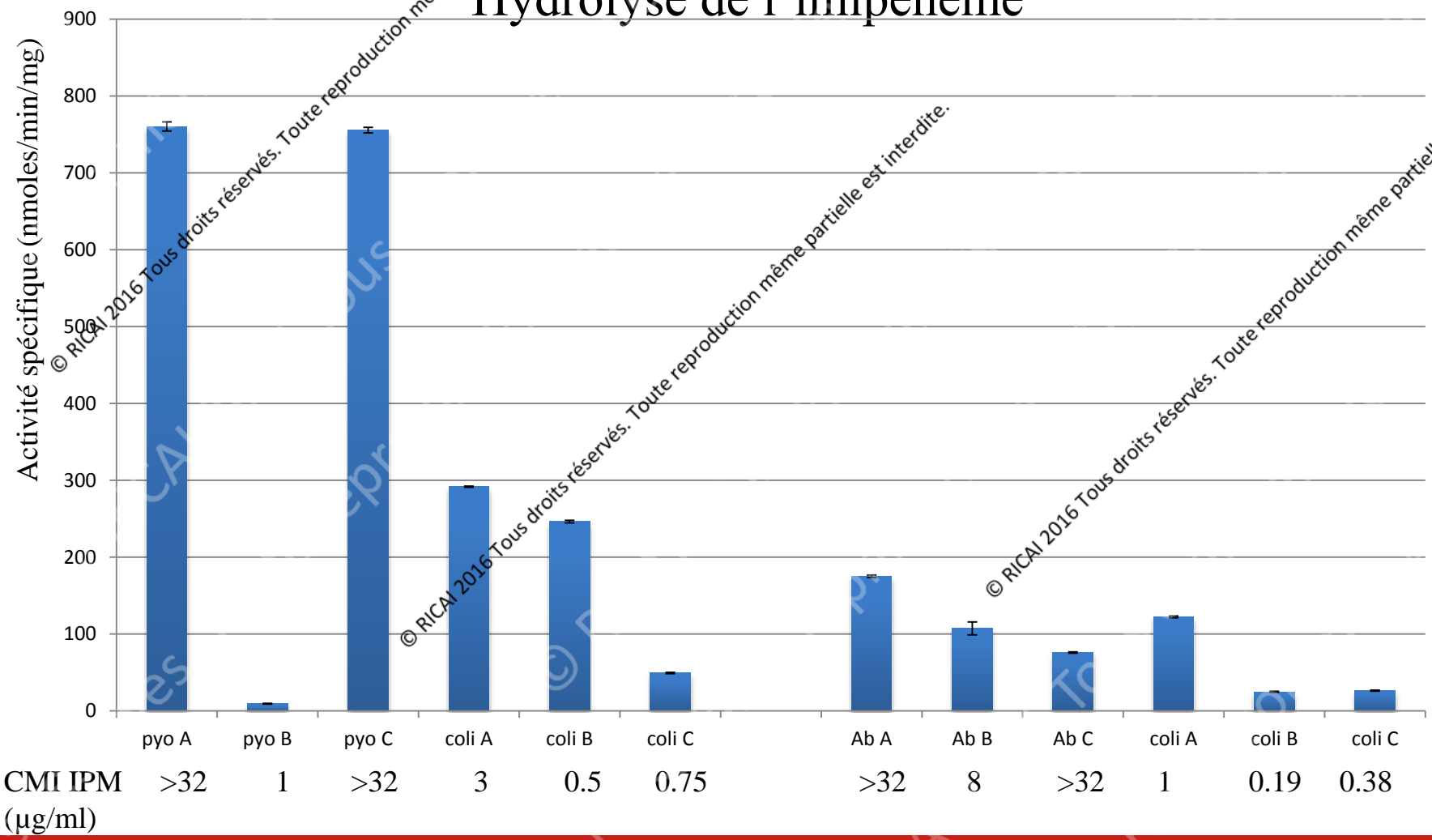
© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

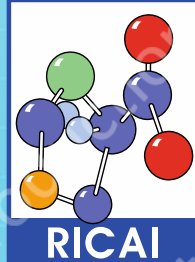
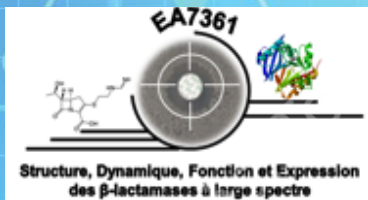


36^{ème} Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse
Lundi 12 et mardi 13 décembre 2016
Palais des Congrès de Paris



Activité spécifique KPC Hydrolyse de l'imipénème





Conclusions

- CMI ceftazidime et carbapénèmes

E. coli : structure A+++

P. aeruginosa : structures A+++ et C+++

A. baumannii : structures A+++ , B++ et C+++

- Niveau de transcription de *bla*_{KPC-2}

E. coli : structure A++

P. aeruginosa : structure C+++

A. baumannii : structures A, B et C faible

- Promoteurs utilisés différents en fonction des espèces
- Nouveaux promoteurs identifiés sur la structure B

- Activité spécifique, hydrolyse de l'imipénème bien corrélée avec les CMI chez *P. aeruginosa*, moins chez *E. coli* et *A. baumannii*

Epidémiologie :

E. coli : A

P. aeruginosa : A >>> B, C

A. baumannii : A

© RICAI 2016 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.