

# Inhibiteurs de $\beta$ -lactamases et *Mycobacterium abscessus*

Fabrice Compain  
- RICAI, Lundi 18 décembre 2017-



UNIVERSITÉ  
**PARIS**  
**DESCARTES**

FACULTÉ  
DE MÉDECINE  
PARIS DESCARTES



**CRC**  
CENTRE DE RECHERCHE  
DES CORDELIERS

INSERM  
UMRS 1138



**Hôpital européen Georges-Pompidou**

Service de Microbiologie

UF de bactériologie

Pr Mainardi

# Conflits d'intérêt

---

– Collaboration scientifique: MSD, AstraZeneca

# Mycobacterium abscessus

Mycobactérie à croissance rapide

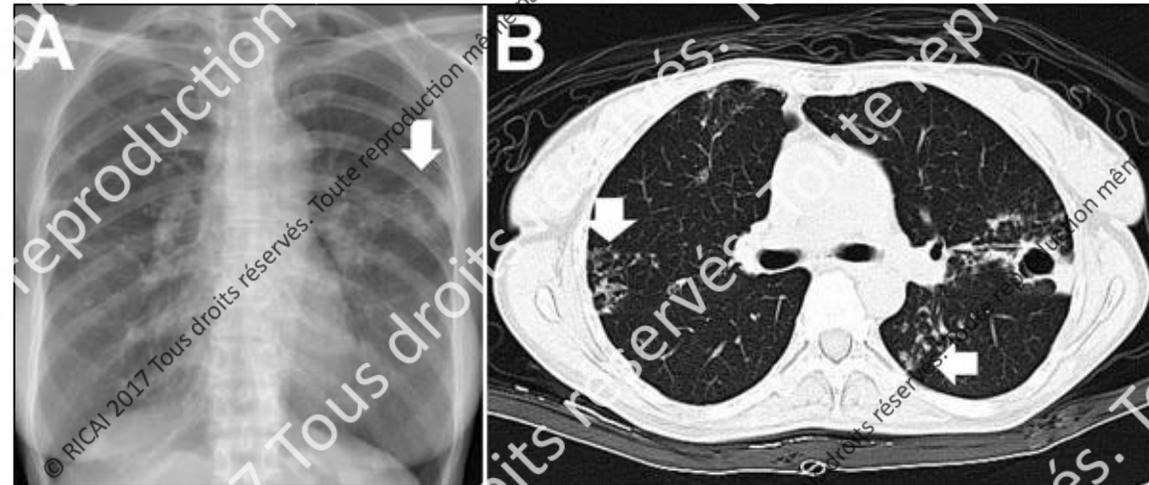
## Infections cutanées

Tatouages, piercings



## Infections pulmonaires

10% NTM; >80% croissance rapide  
- DDB, mucoviscidose (2-6%; 50% NTM)



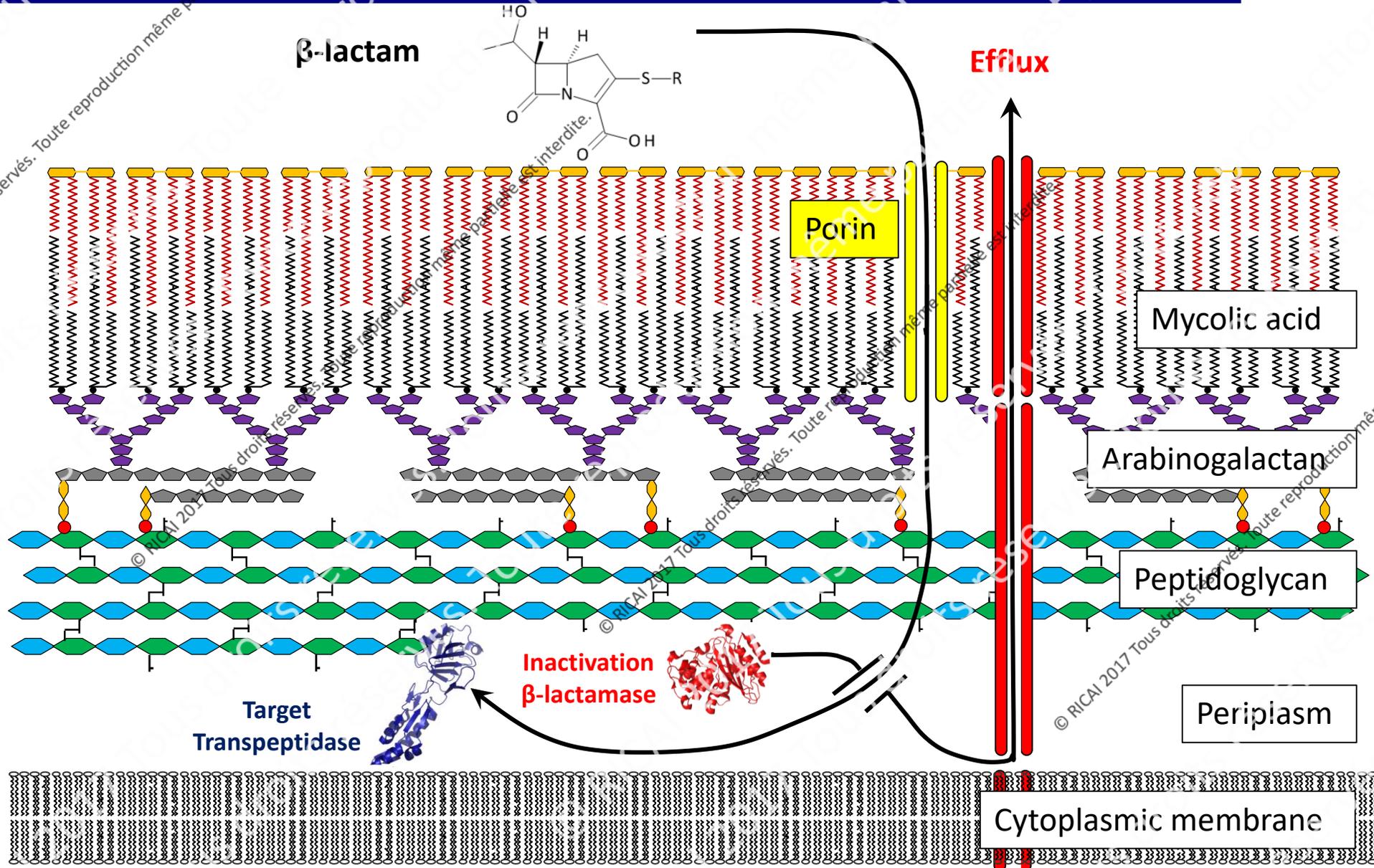
## Traitement

**$\beta$ -lactamine (cefoxitine ou imipénème) ou Tigécycline  
+ Macrolide (clarithromycine/azithromycine)  
+ Aminoside (amikacine)**

**20-50%  
de succès**

**2<sup>ème</sup> ligne : minocycline, clofazimine, moxifloxacine, linézolide**

# *Mycobacterium abscessus* : Résistance naturelle aux $\beta$ -lactamines



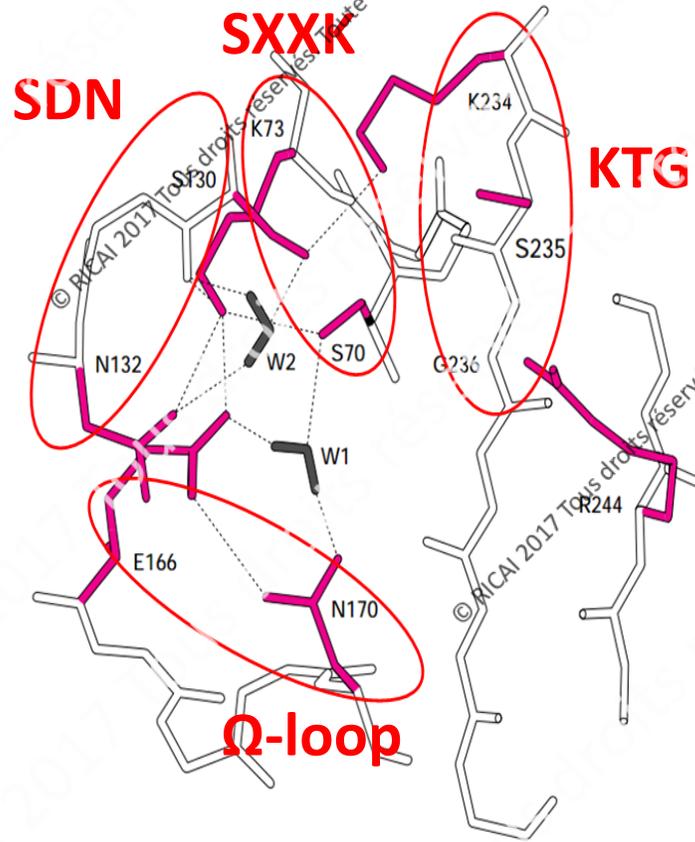
# Mycobacterium abscessus : CMI des $\beta$ -lactamines

**Table 2.** MICs of  $\beta$ -lactams for *M. abscessus* CIP104536

$\beta$ -Lactam	MIC (mg/L)
<b>Penam</b>	
amoxicillin	>256
ampicillin	>256
benzylpenicillin	>256
piperacillin	>256
ticarcillin	>256
terocillin	>256
<b>Cephem</b>	
cefalotin	>256
cefuroxime	>256
cefamandole	>256
ceftriaxone	>256
ceftaxime	>256
<b>cefoxitin</b>	<b>32</b>
ceftazidime	>256
<b>Carbapenem</b>	
<b>imipenem</b>	<b>8</b>
meropenem	16
ertapenem	256
doripenem	16
<b>Monobactam</b>	
aztreonam	>256

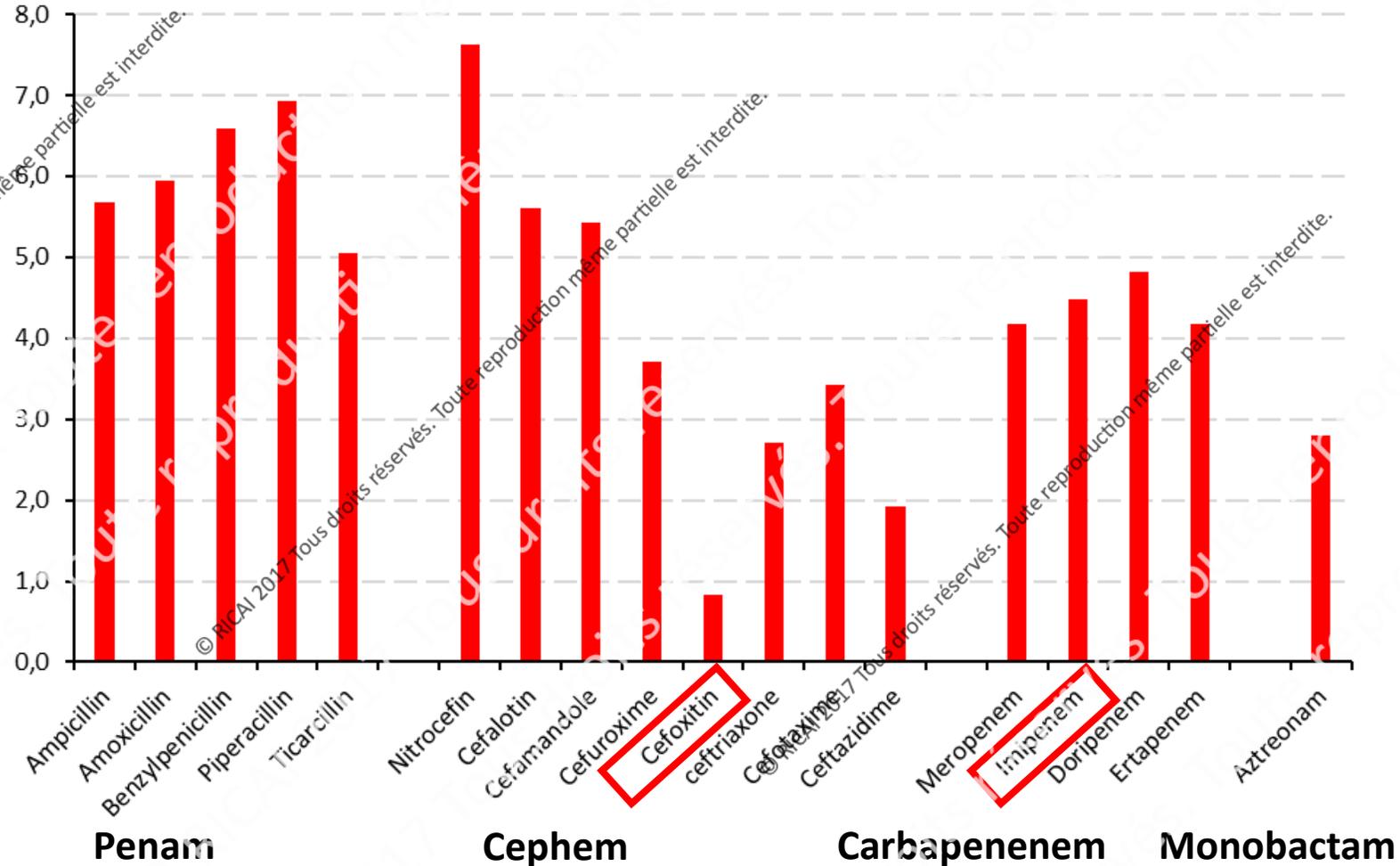
Drug	Clinical isolates (no. of strains)	No. of strains with indicated MIC					MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
		≤4	8	16	32	64		
<b>FOX</b>	All (43)		9	30	4		<b>16</b>	<b>16</b>
	<i>M. abscessus</i> (15)		6	9			16	16
	<i>M. bolletii</i> (14)		1	11	2		16	32
	<i>M. massiliense</i> (14)		2	10	2		16	32
	Smooth (25)		8	17			16	16
	Rough (18)		1	13	4		16	32
<b>IPM</b>	All (43)	36	5	2			<b>≤4</b>	<b>8</b>
	<i>M. abscessus</i> (15)	11	2	2			≤4	16
	<i>M. bolletii</i> (14)	11	3				≤4	8
	<i>M. massiliense</i> (14)	14					≤4	≤4
	Smooth (25)	23	2				≤4	≤4
	Rough (18)	13	3	2			≤4	16

# *Mycobacterium abscessus* : $\beta$ -lactamase de classe A

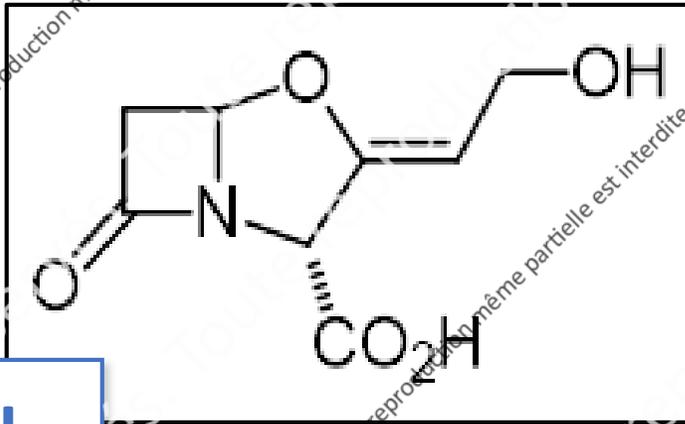


Catalytic efficiency

$\text{Log}_{10}$   
 $k_{\text{cat}}/K_m$   
 $(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$

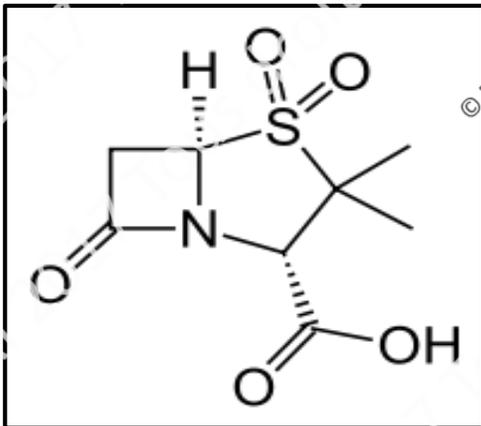


# Inhibiteurs de $\beta$ -lactamases : « Ancienne génération »

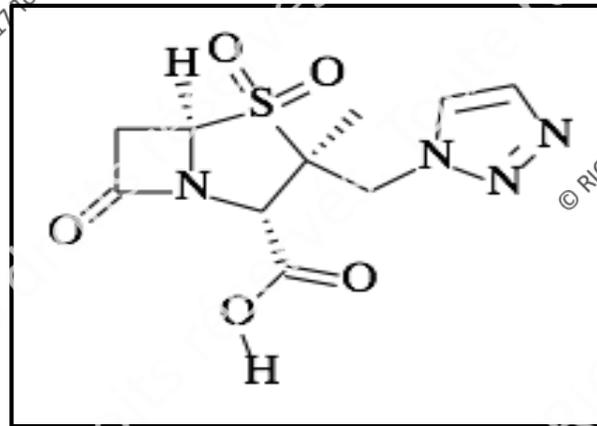


CLAVULANIC ACID

Noyau  
 $\beta$ -lactam



SULBACTAM

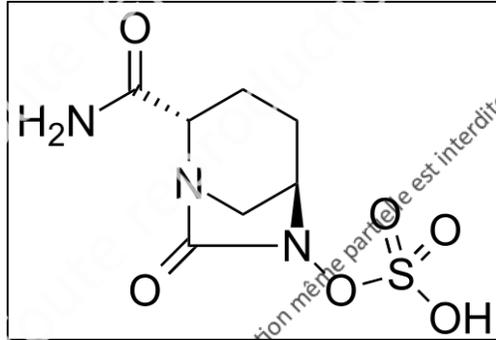


TAZOBACTAM

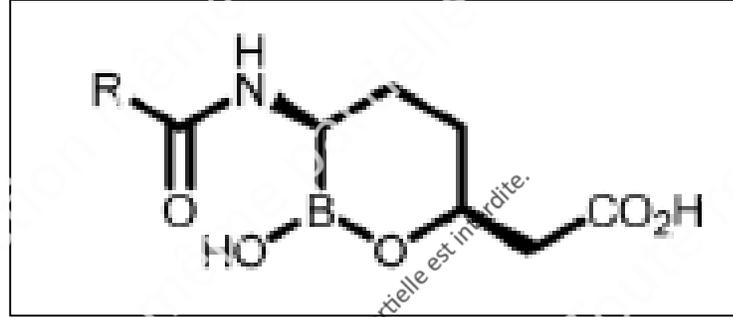
## Activité *in vitro* du clavulanate sur *M. tuberculosis* H37Rv

Beta-lactam agent	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Without clavulanate	With clavulanate (5 $\mu\text{g/ml}$ )
Penicillin G	256	1
Piperacillin	>128	0.25
Amoxicillin	64	1
Ampicillin	32	2
Faropenem	4	2
Imipenem	4	0.5
Meropenem	8	1
Cefixime	32	16
Cefotaxime	2	1
Cefpodoxime	>128	32
Cephaloridine	4	0.25
Isoniazid	0.06	0.06

# Inhibiteurs de $\beta$ -lactamases : « Nouvelle génération »



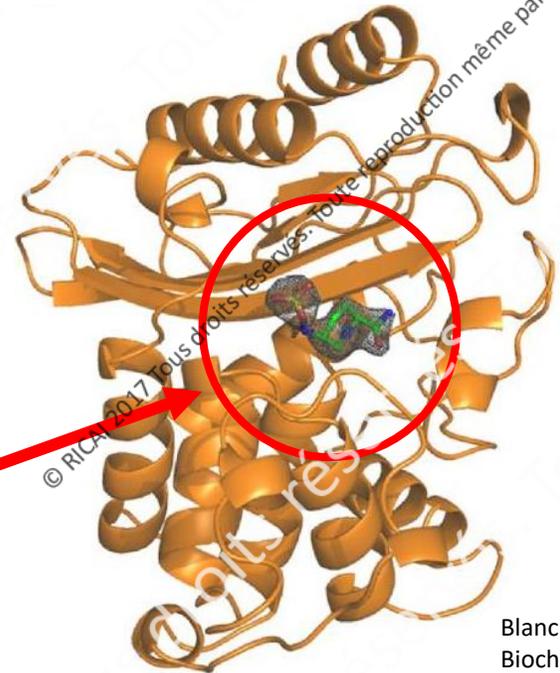
**AVIBACTAM**  
(DIAZABICYCLOOCTANE)



**RXP7009**  
(BORONIC ACID DERIVATIVES)

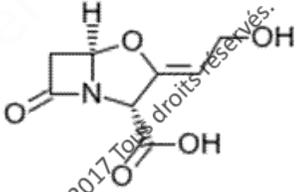
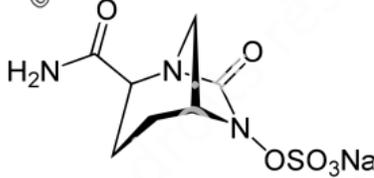
... mécanisme d'action similaire aux inhibiteurs « ancienne génération » :

Site actif commun aux  $\beta$ -lactamines  
et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases  
(clavulanate, avibactam)



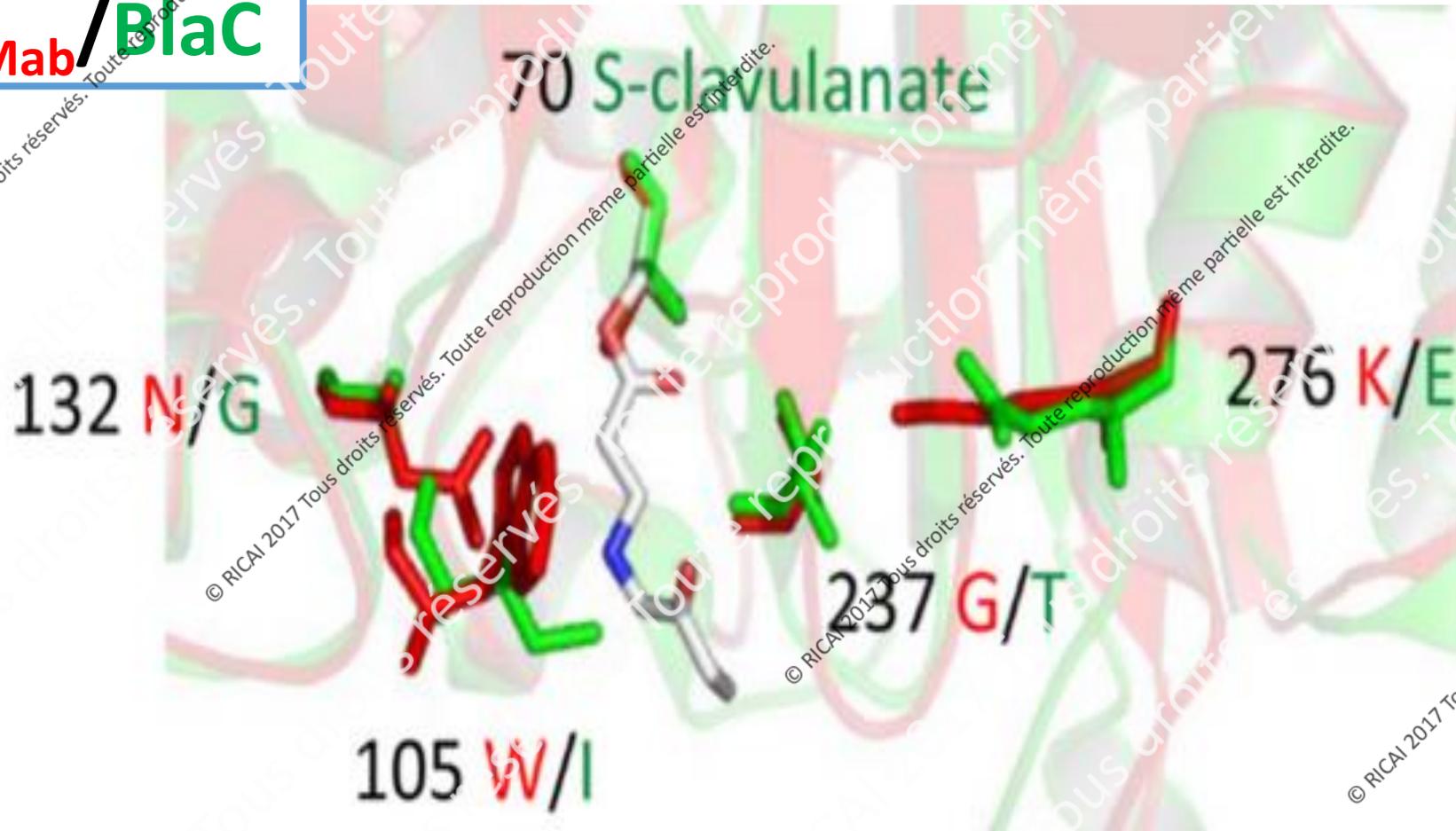
# Inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

## Inhibition of $\beta$ -lactamases from mycobacteria

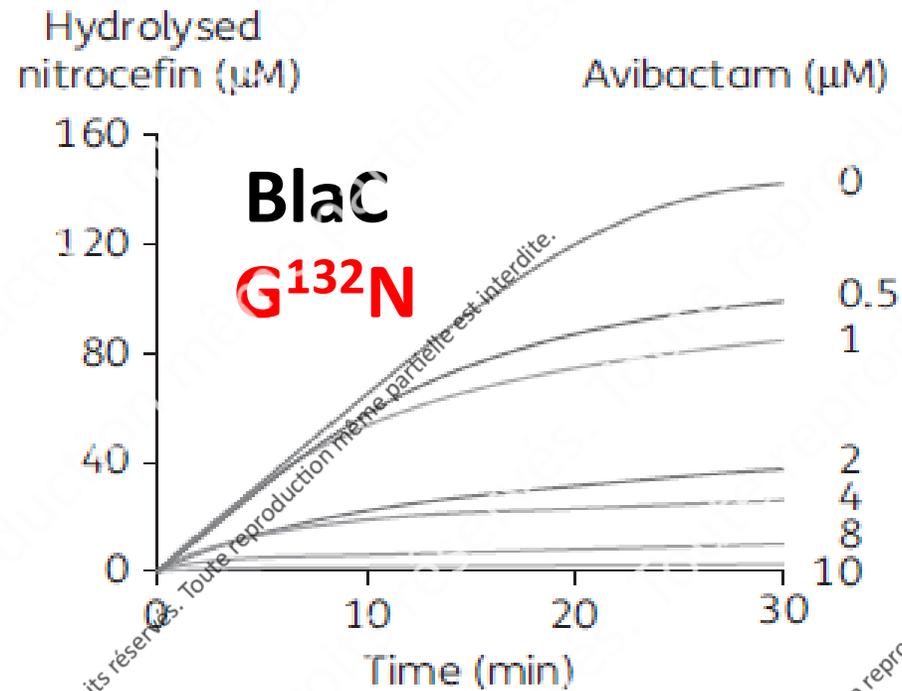
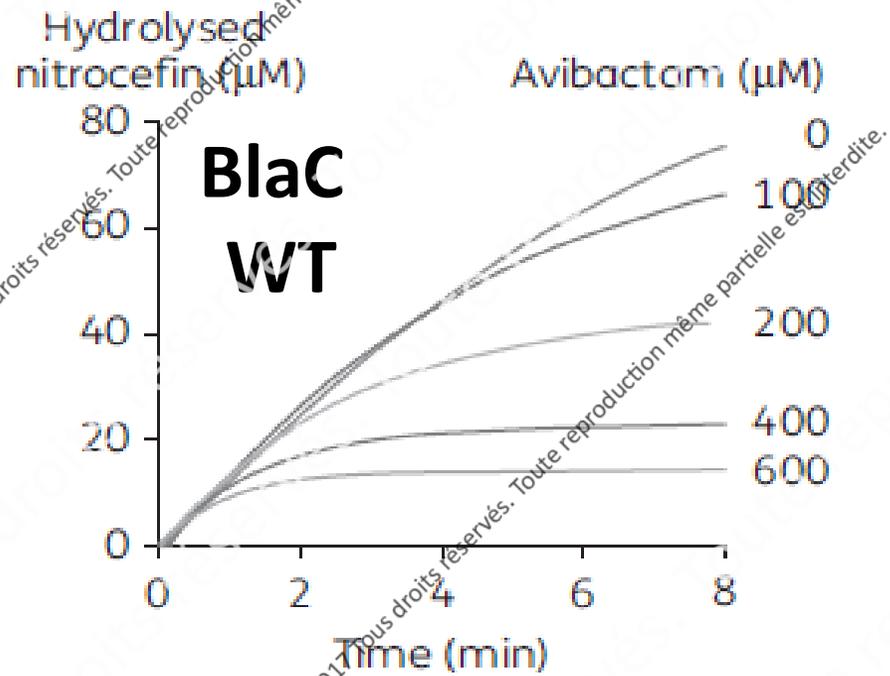
$\beta$ -lactamase Inhibitor	BlaC <i>M. tuberculosis</i>	Bla <sub>Mab</sub> <i>M. abscessus</i>
Clavulanate 	<b>Irreversible inactivation</b>	Hydrolysis $k_{\text{cat}} / K_m = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Avibactam 	Slow inhibition $k_2 / K_i = 61 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	<b>Rapid inhibition</b> $k_2 / K_i = 480,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

# BlaC (*M. tuberculosis*) vs Bla<sub>Mab</sub> (*M. abscessus*) : Résidu N<sup>132</sup>

**Bla<sub>Mab</sub>/BlaC**



# Résidu N<sup>132</sup> et inhibition par l'avibactam

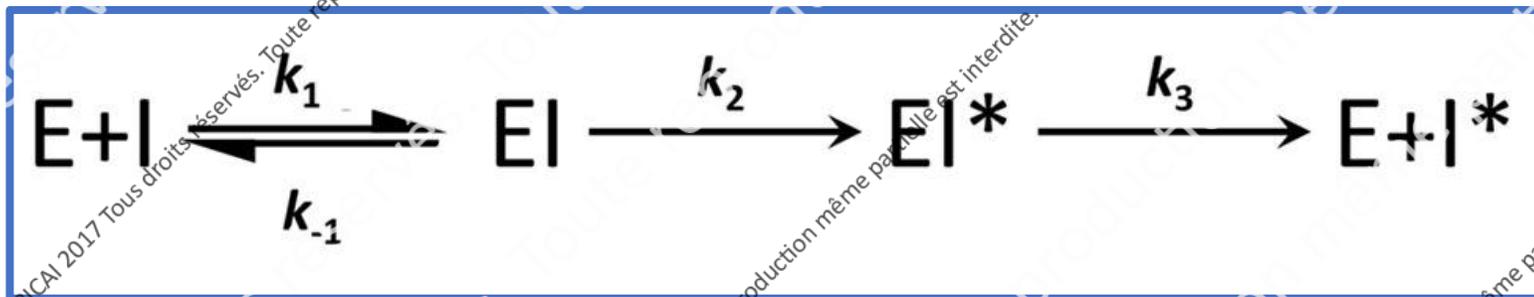


MIC (mg/L) of amoxicillin in the presence of the indicated inhibitor

**Expression  
chez *E. coli***

β-Lactamase	none	avibactam (4 mg/L)	clavulanate (4 mg/L)
None	2	2	2
Bla <sub>Mab</sub>	>512	4	>512
BlaC	512	64	8
Bla <sub>Mab</sub> N <sup>132</sup> G	>512	64	32
BlaC G <sup>132</sup> N	512	2	64

# Résidu N<sup>132</sup> : Hydrolyse du Clavulanate



$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$$

$$K_M = \frac{k_3}{k_1} \left( \frac{k_{-1} + k_2}{k_2 + k_3} \right)$$

**Bla<sub>C</sub>**

Clavulanate

Substitution(s)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
None	NA	NA	NA
I <sup>105</sup> W	NA	NA	NA
G <sup>132</sup> N	<20	$0.41 \pm 0.1$	$>2.1 \times 10^4$
I <sup>105</sup> W and G <sup>132</sup> N	<50	$0.50 \pm 0.04$	$>1.0 \times 10^4$

**Bla<sub>Mab</sub>**

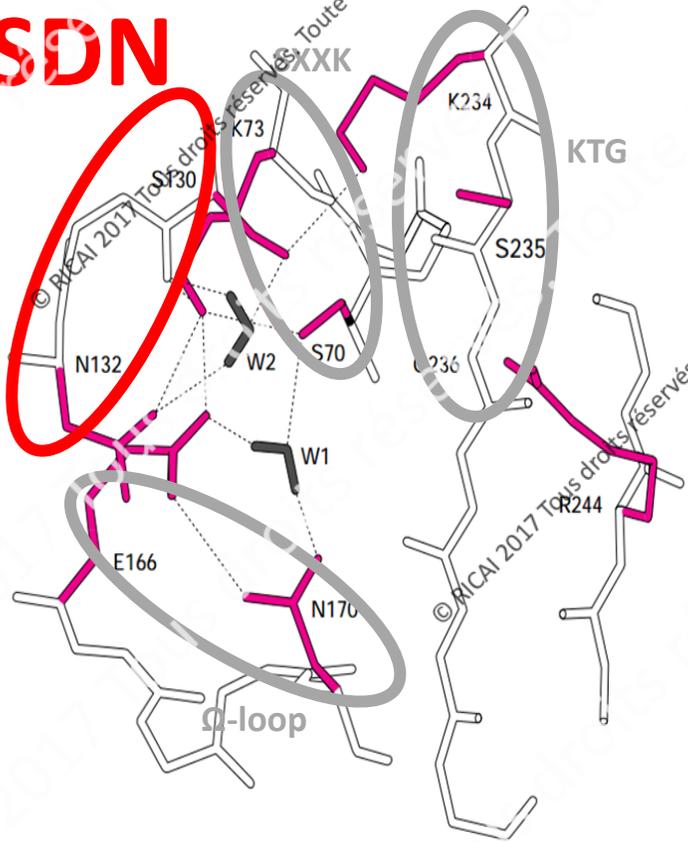
$\beta$ -Lactamase<sup>a</sup>  $k_{cat}/K_m$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

Bla<sub>Mab</sub>  $2.1 + 0.7 \times 10^5$

Bla<sub>Mab</sub> N<sup>132</sup>G  $8.3 \pm 2.5 \times 10^1$

# BlaC (*M. tuberculosis*) vs Bla<sub>Mab</sub> (*M. abscessus*) : Résidu N<sup>132</sup>

SDN



β-lactamase de classe A

SDG<sup>132</sup>



SDN<sup>132</sup>

# β-lactamines ± avibactam et *M. abscessus* : CMI

β-lactam	MIC (μg/ml) against:		
	Wild type	Δ <i>bla</i> <sub>Mab</sub>	Wild type avibactam 2 μg/ml
<b>Cefoxitin</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>Imipenem</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>Amoxicillin</b>	<b>&gt; 256</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Cefalotin</b>	<b>&gt; 256</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Cefamandole</b>	<b>128</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Ceftriaxone</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	<b>8</b>

## Ceftaroline + Avibactam

Isolate	Subspecies	MIC (μg/ml) <sup>c</sup>	
		Ceftaroline	Ceftaroline + avibactam
1	<i>abscessus</i>	4	0.5
2	<i>abscessus</i>	64	2
3	<i>abscessus</i>	4	0.5
4	<i>abscessus</i>	4	1
5	<i>abscessus</i>	4	0.5
6	<i>abscessus</i>	16	1
7	<i>abscessus</i>	8	2
8	<i>abscessus</i>	16	2
9	<i>bolletii</i>	2	1
10	<i>bolletii</i>	8	2

# Carbapénèmes ± avibactam et *M. abscessus* : CMI

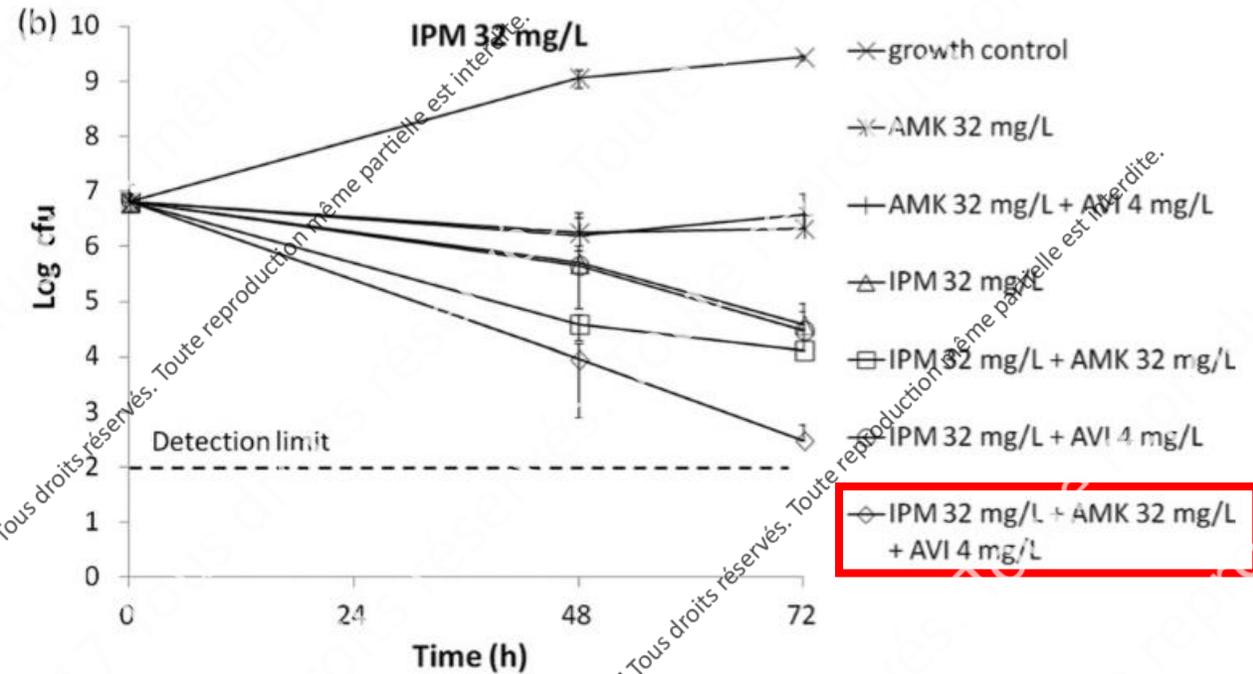
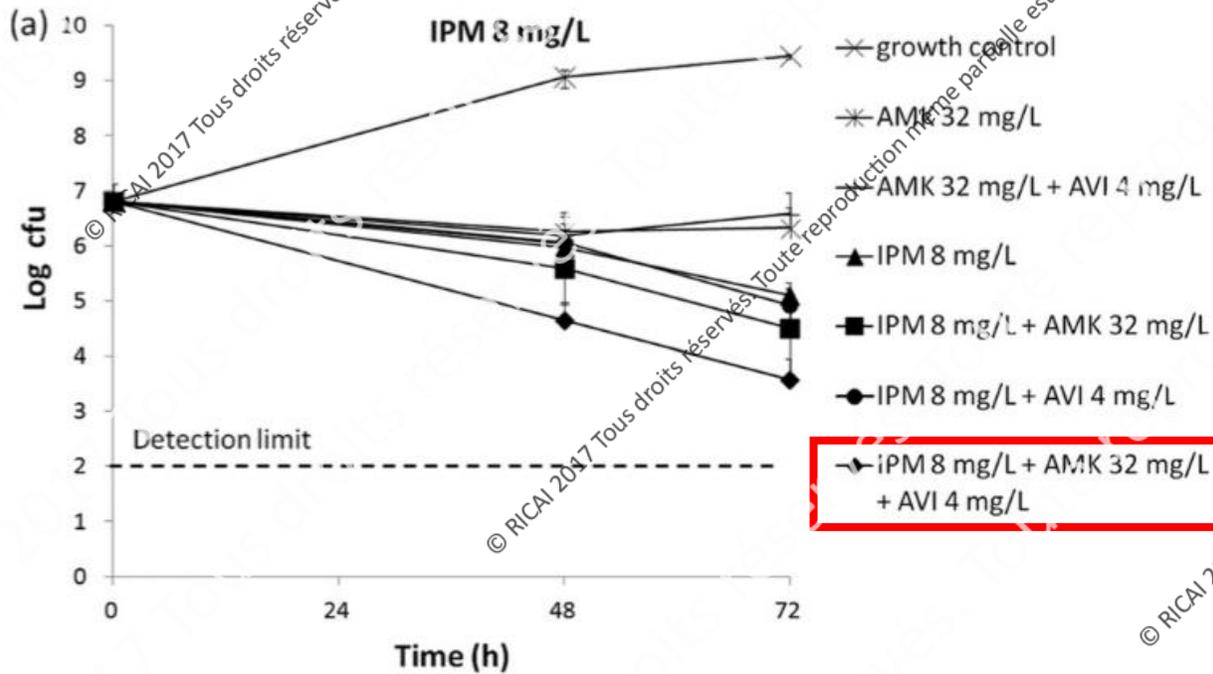
- 28 souches multi-R
- Microdilution en 7H9

		MIC (µg/mL)		
		MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range
Imipenem	Alone	16	32	4 – 32
	+ Avibactam	16	32	4 – 32
Meropenem	Alone	16	128	8 – 128
	+ Avibactam	4	8	4 – 16
Tebipenem	Alone	256	> 256	128 – > 256
	+ Avibactam	8	16	4 – 32

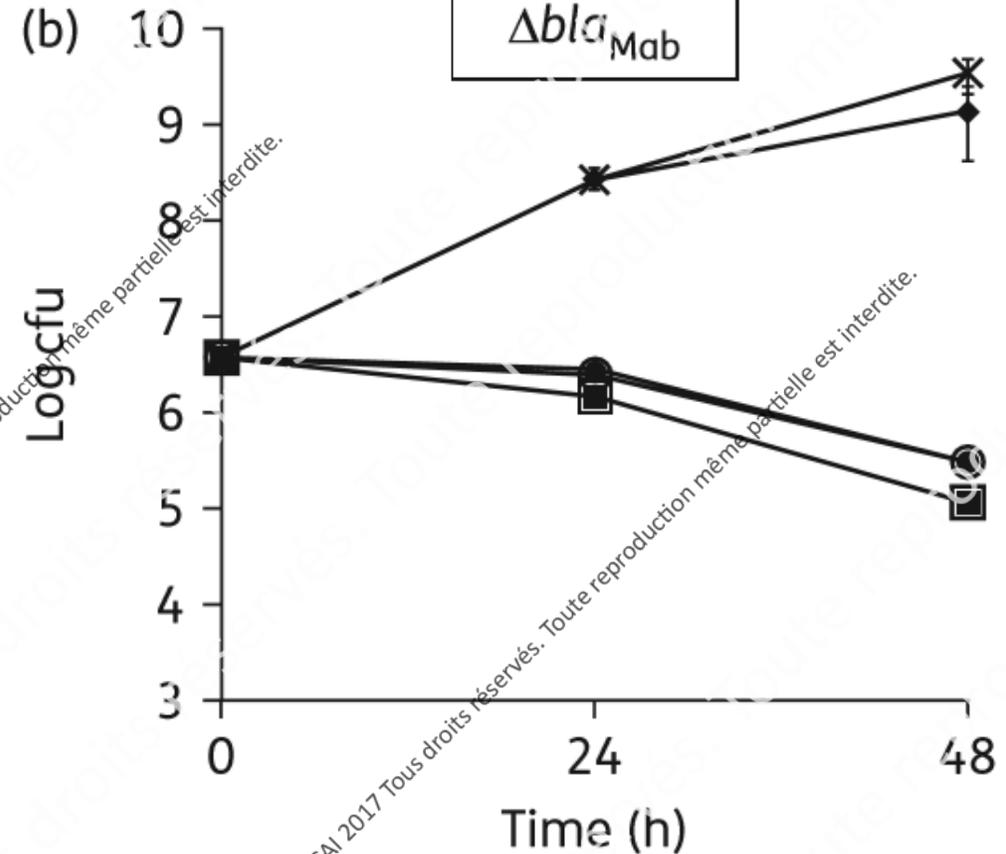
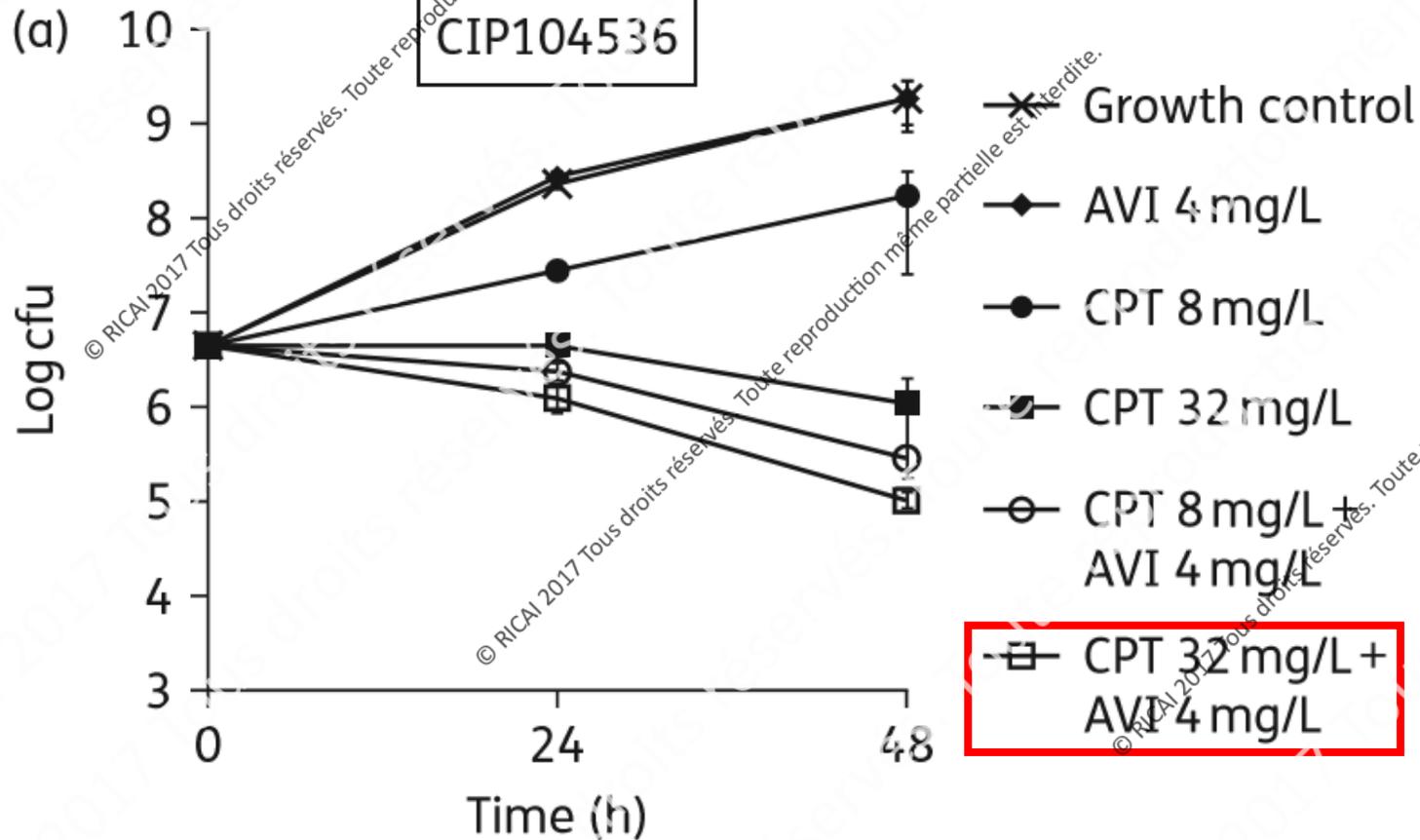
⇒ Variable selon le carbapénème

⇒ CMI = 4-8 mg/L minimum

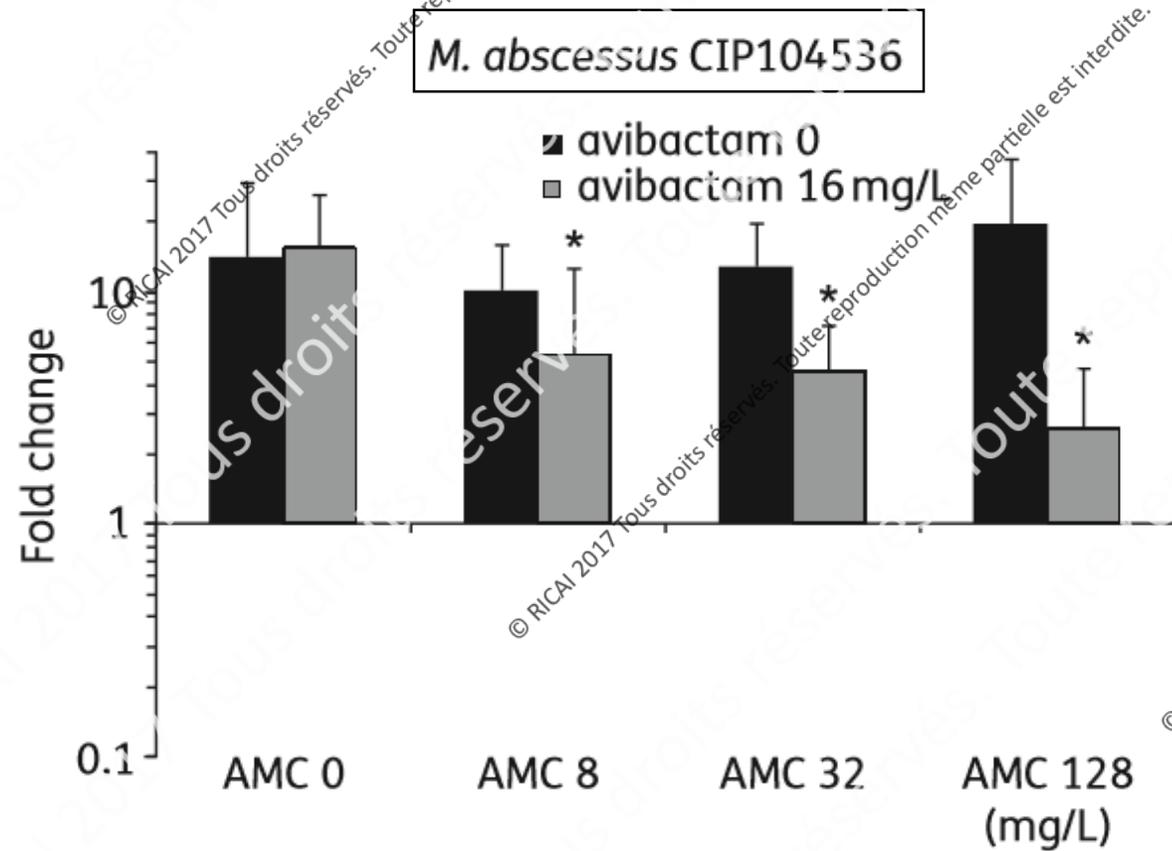
# Carbapénèmes ± avibactam : Bactéricidie



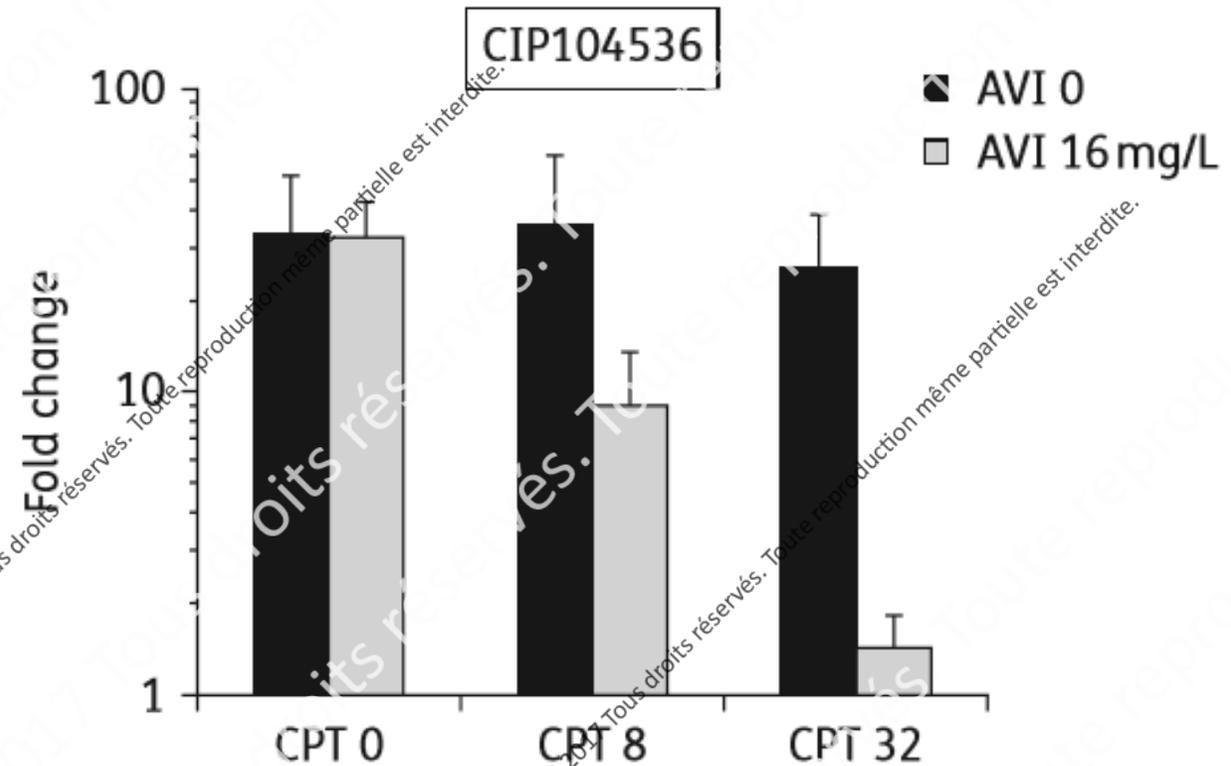
# Ceftaroline ± avibactam : Bactéricidie



# $\beta$ -lactamines $\pm$ avibactam : Activité intra-macrophagique

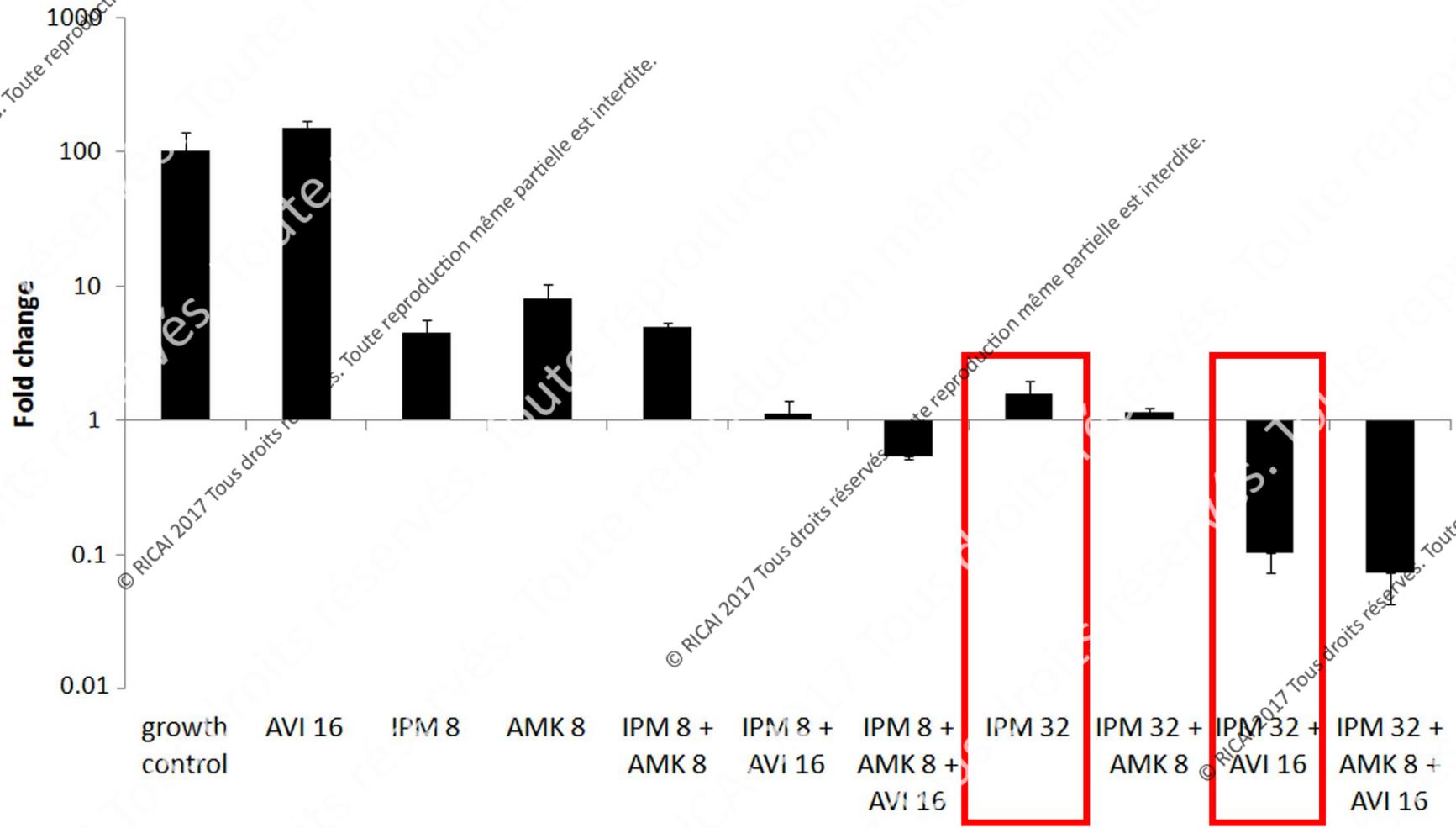


**Amoxicilline  $\pm$  avibactam**

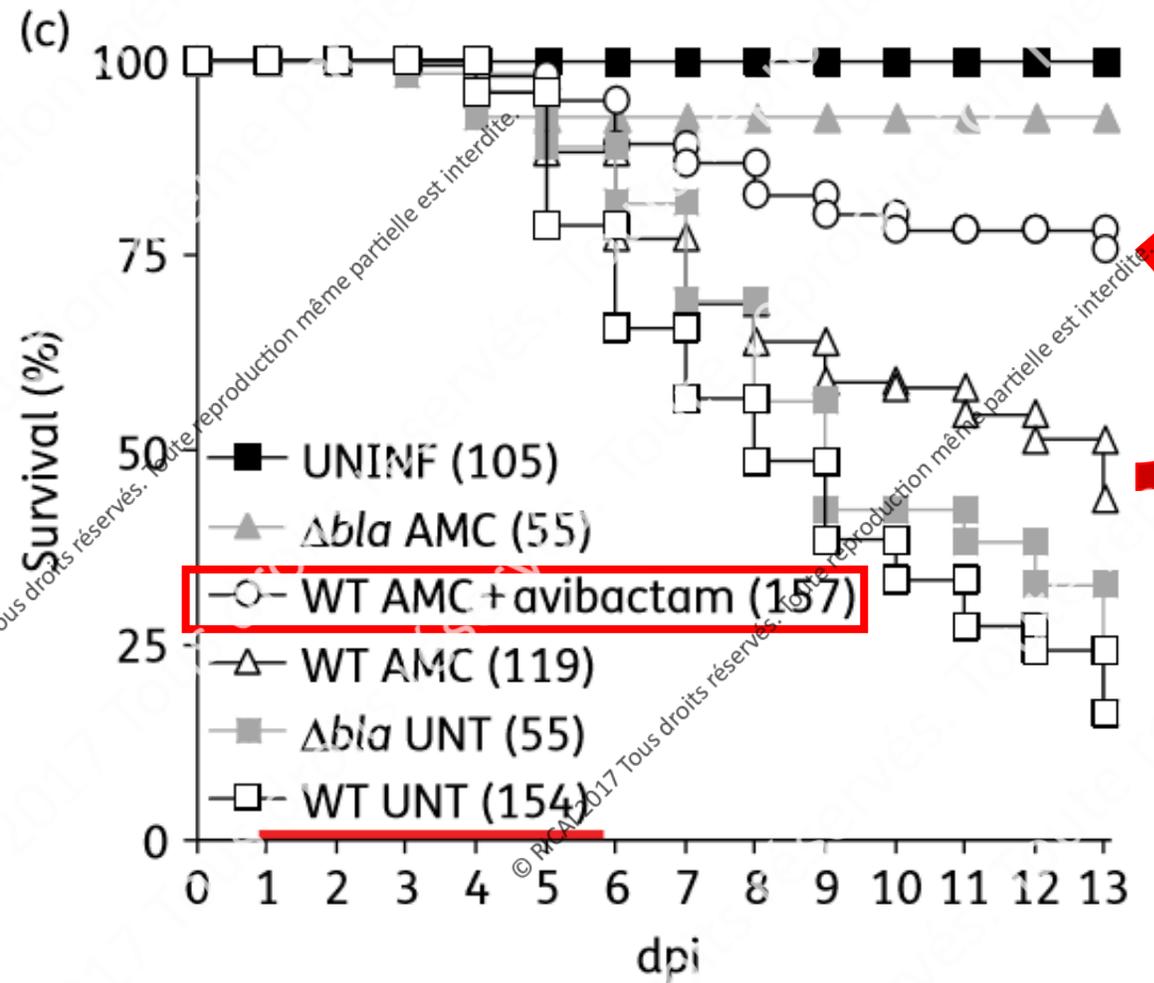
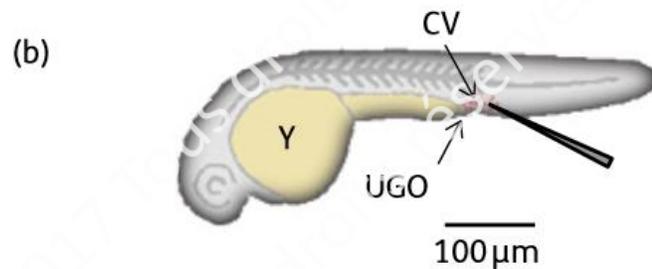
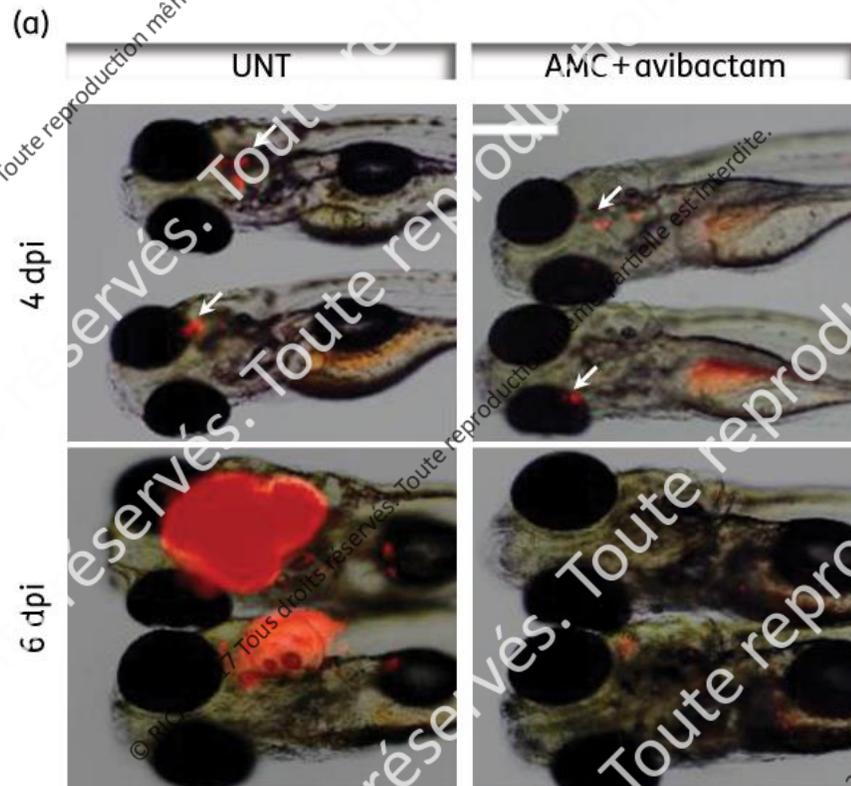


**Ceftaroline  $\pm$  avibactam**

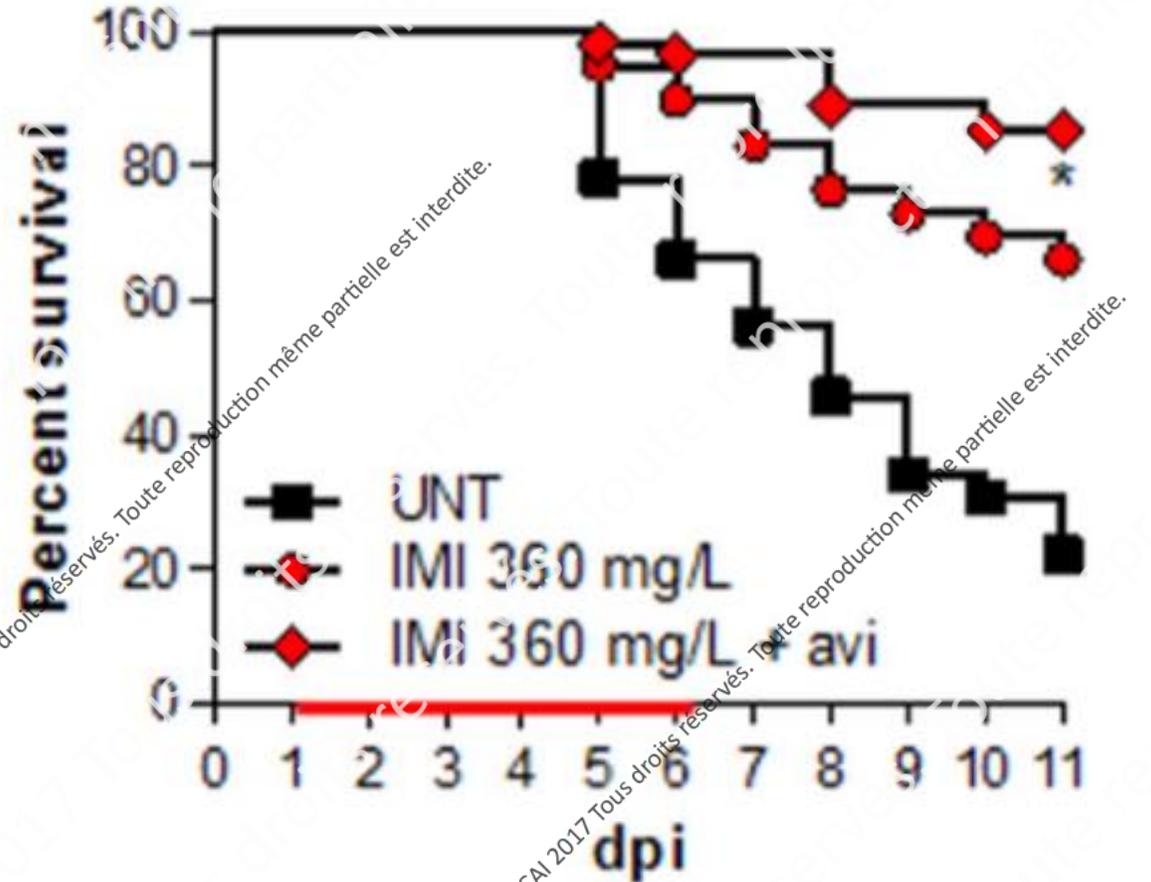
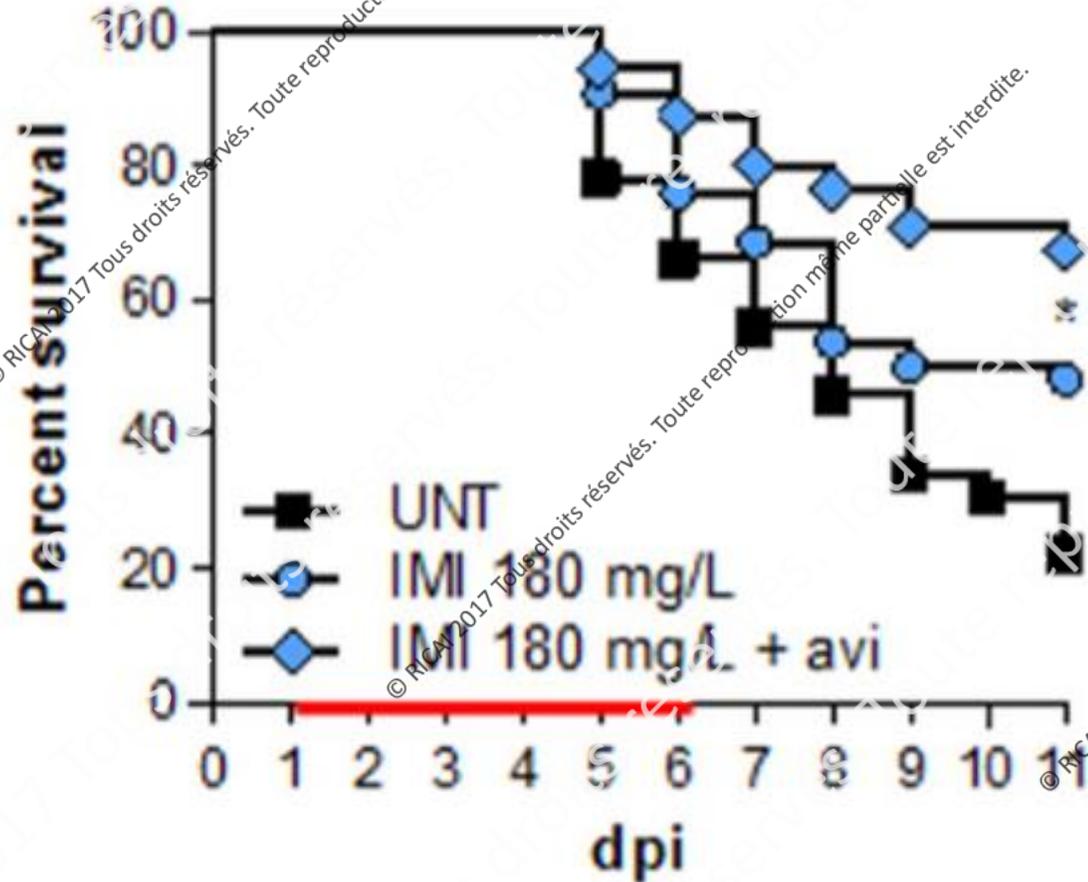
# $\beta$ -lactamines $\pm$ avibactam : Activité intra-macrophagique



# $\beta$ -lactamines $\pm$ avibactam : Modèle zebrafish



# $\beta$ -lactamines $\pm$ avibactam : Modèle zebrafish



# Conclusions

---

- Inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases traditionnels hydrolysés par Bla<sub>Mab</sub>
- Activité inhibitrice des diazabicyclooctanes (avibactam) et potentialisation de l'activité de l'imipénème
  - *In vitro* (CMI, Bactéricidie, Macrophages)
  - *In vivo* (Modèle zebrafish)
- Perspectives
  - Ajout de l'avibactam au traitement « traditionnel » (IPM + AN + CLR) ?
  - Nouveaux DBO : Relebactam + Imipénème

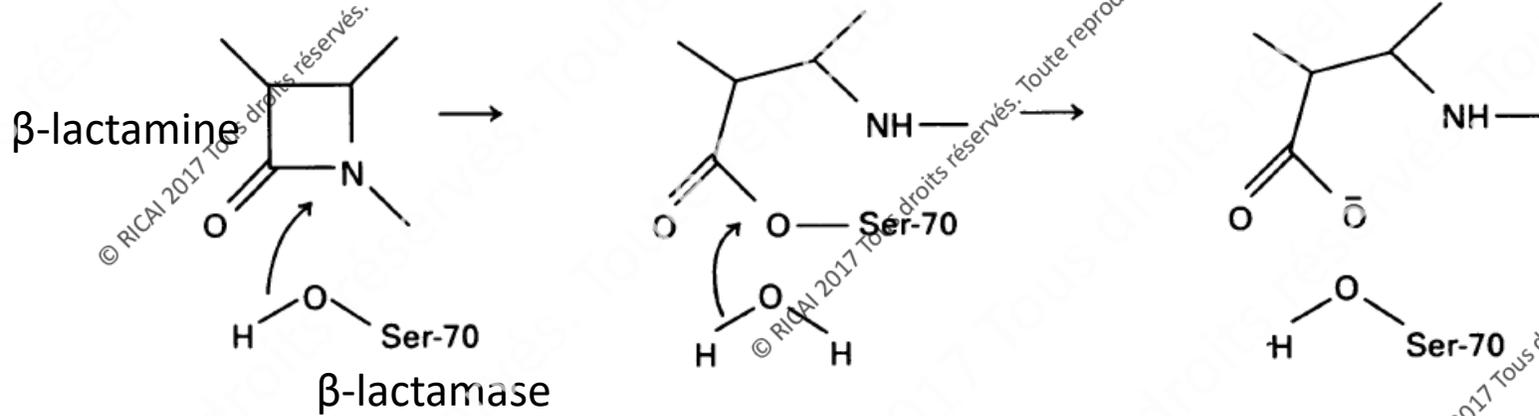
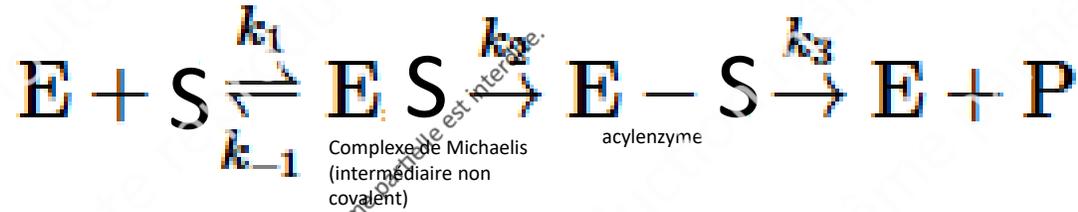
© RICAI 2017 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2017 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2017 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

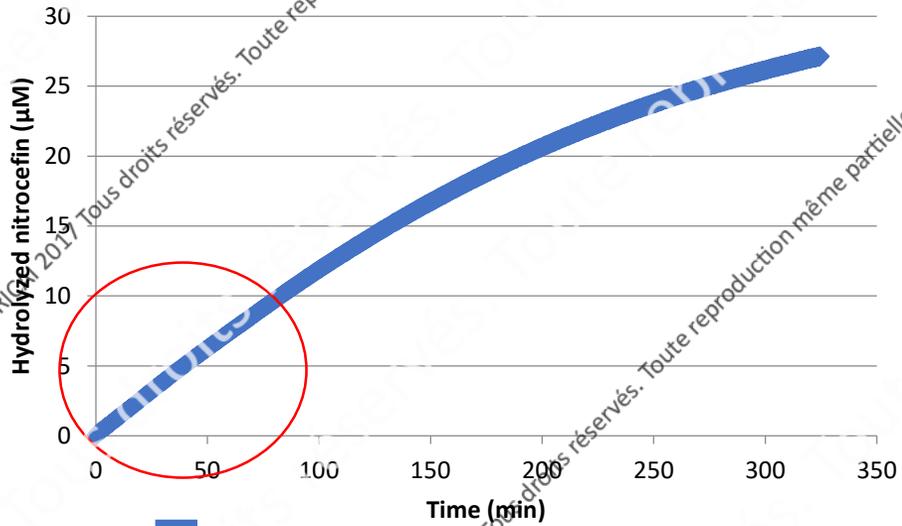
© RICAI 2017 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Méthodes

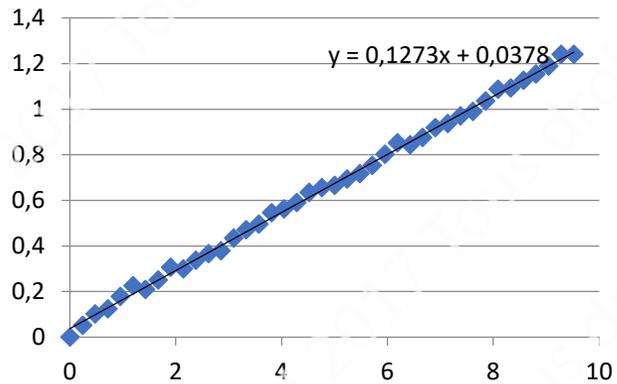


# Méthodes

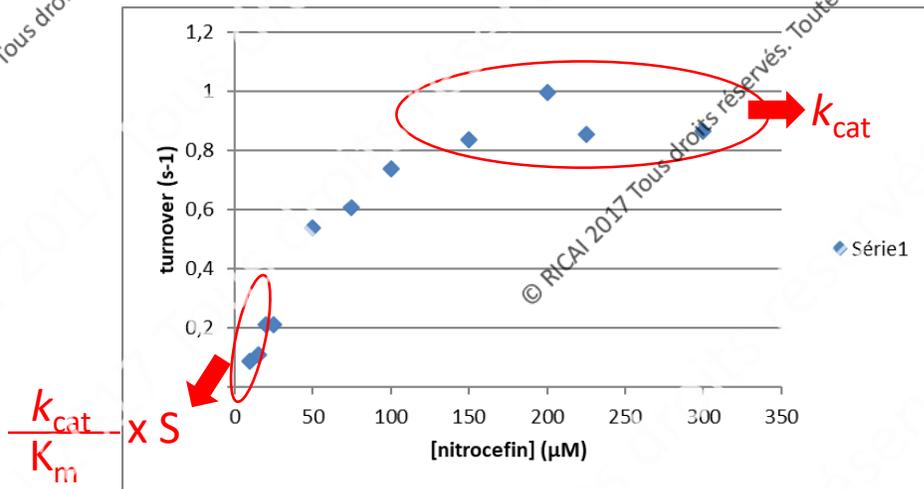
## Détermination des paramètres cinétiques ( $k_{cat}$ , $K_m$ ) :



Détermination de la vitesse initiale maximale en concentration saturante de substrat



$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \rightarrow \quad \text{Turnover} = k_{cat} \times \frac{S}{K_m + S}$$



# Méthodes

## Détermination des paramètres d'inhibition par l'avibactam :

