

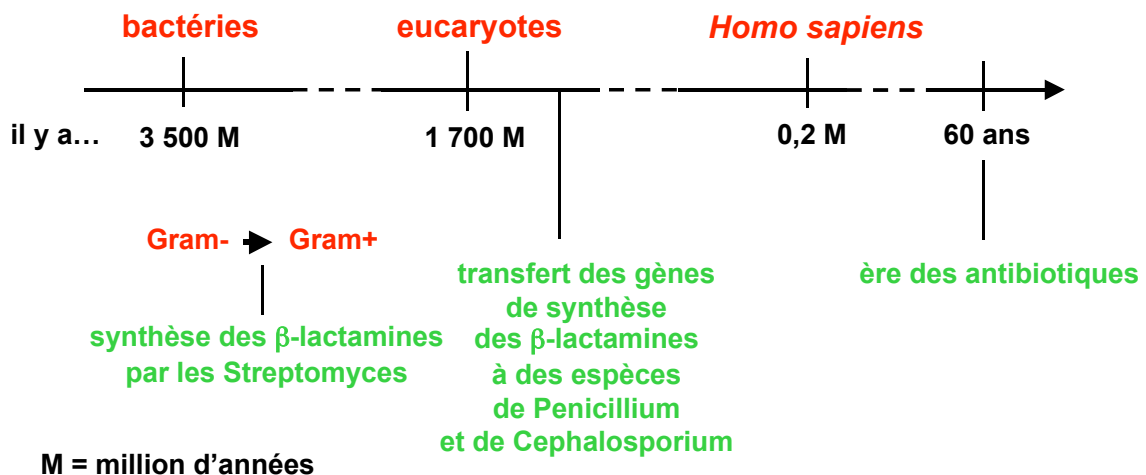
Organisation génétique des céphalosporinases acquises

Charlotte Verdet

Laboratoire de Microbiologie EA2392
Université Paris VI Pierre et Marie Curie – site Saint Antoine

Introduction (1)

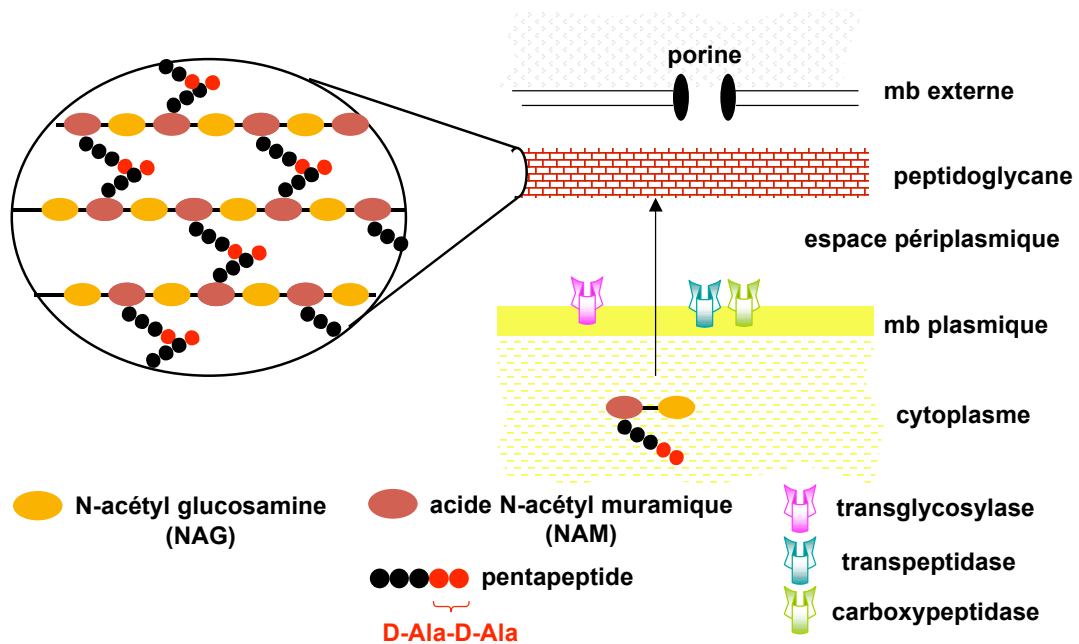
Echelle de l'évolution des organismes vivants



d'après Medeiros CID 1997

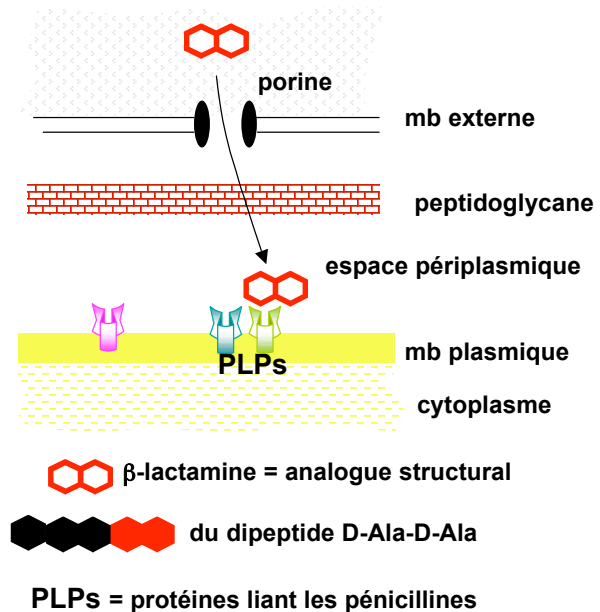
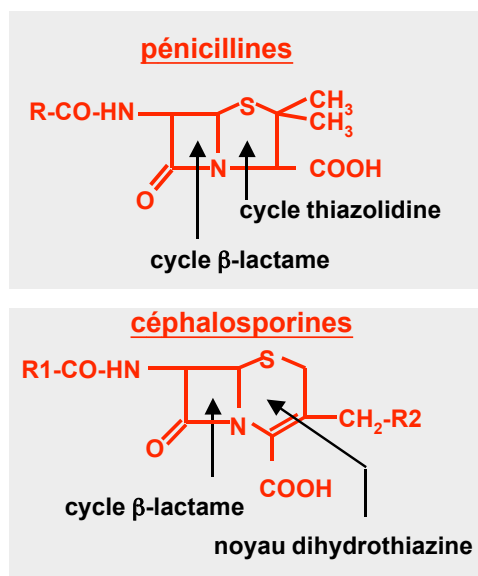
Introduction (2)

Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram -



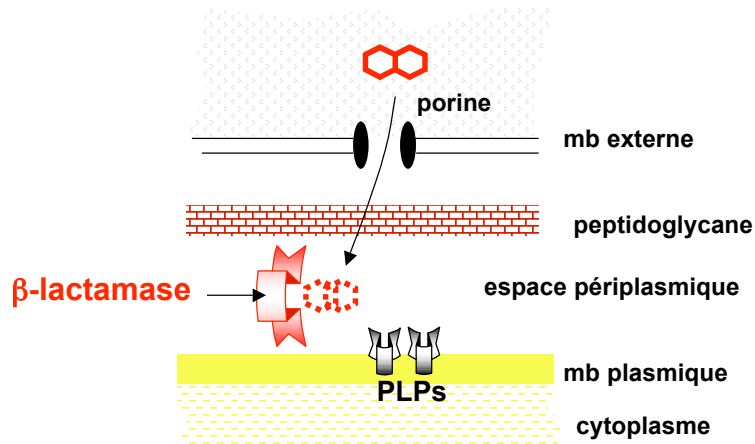
Introduction (3)

Mode d'action des β -lactamines : inhibition de la synthèse du peptidoglycane



Introduction (4)

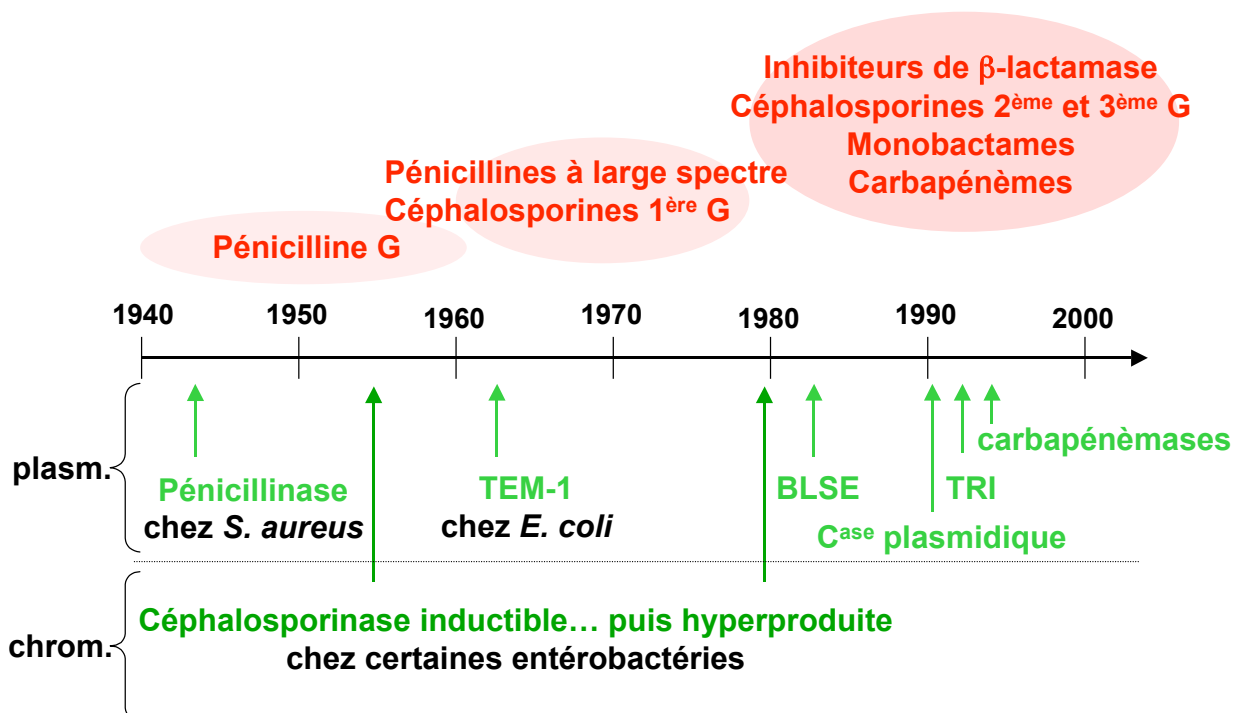
Mécanismes de résistance développés par les bactéries



- 1°) ↓ perméabilité
- 2°) surexpression de l'efflux
- 3°) ↓ affinité des PLPs ou PLP additionnelle
- 4°) production de β -lactamases : entérobactéries +++

Evolution des β -lactamases

sous la contrainte des β -lactamines élaborées par l'industrie pharmaceutique

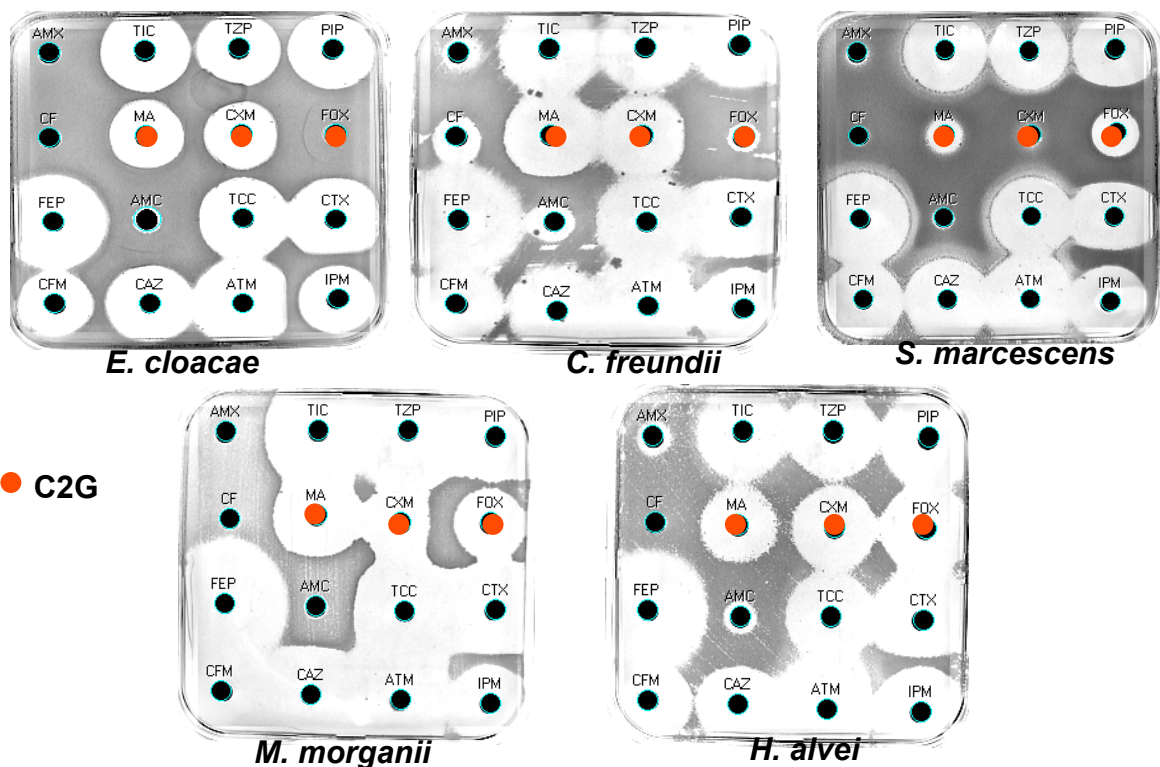


Classification des β -lactamases

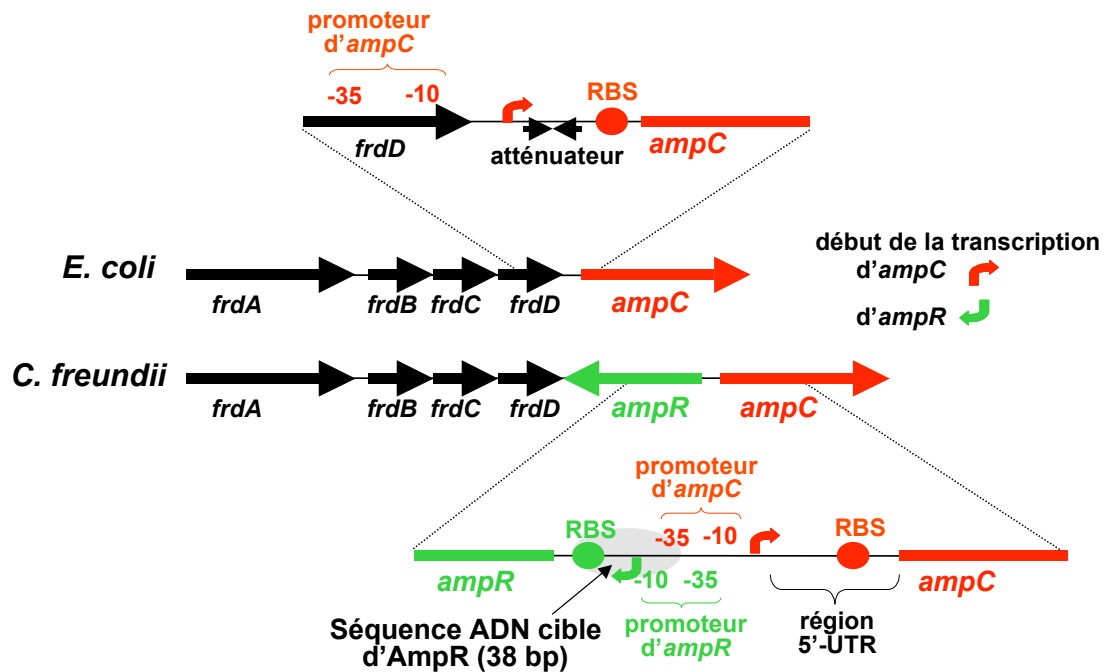
Ambler	Bush	Activité							Inhibition par l'acide clavulanique
		pénicilline	carbénicilline	oxacilline	céfaloridine	céfotaxime	aztréonam	imipénème	
A	2a	+++	+	-	+/-	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
	2br	+++	+	+	+	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	+
C	1	++	+/-	inhibiteur	+++	+	inhibiteur	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	+/-
nd	4	++	++	++	V	V	-	-	-
B	3	++	++	++	++	++	-	++	-

nd, non déterminé ; V, variable

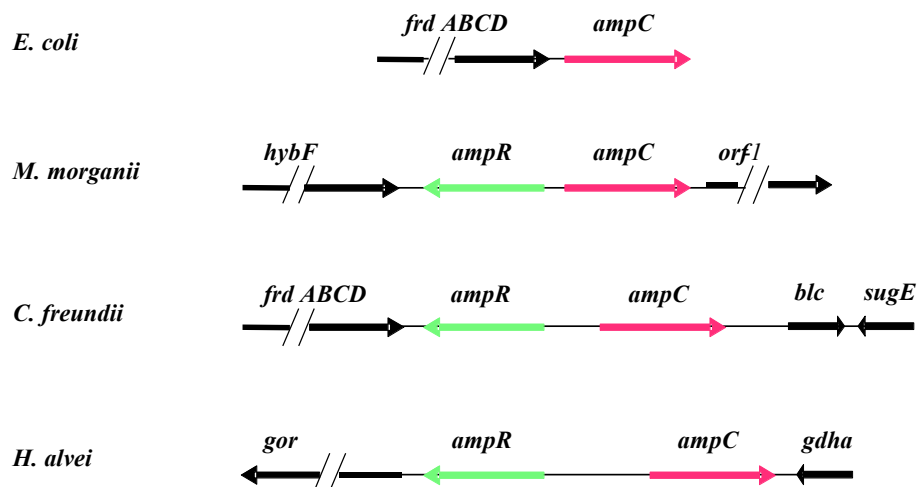
Les céphalosporinases chromosomiques spécifiques d'espèces entérobactéries de l'environnement +++



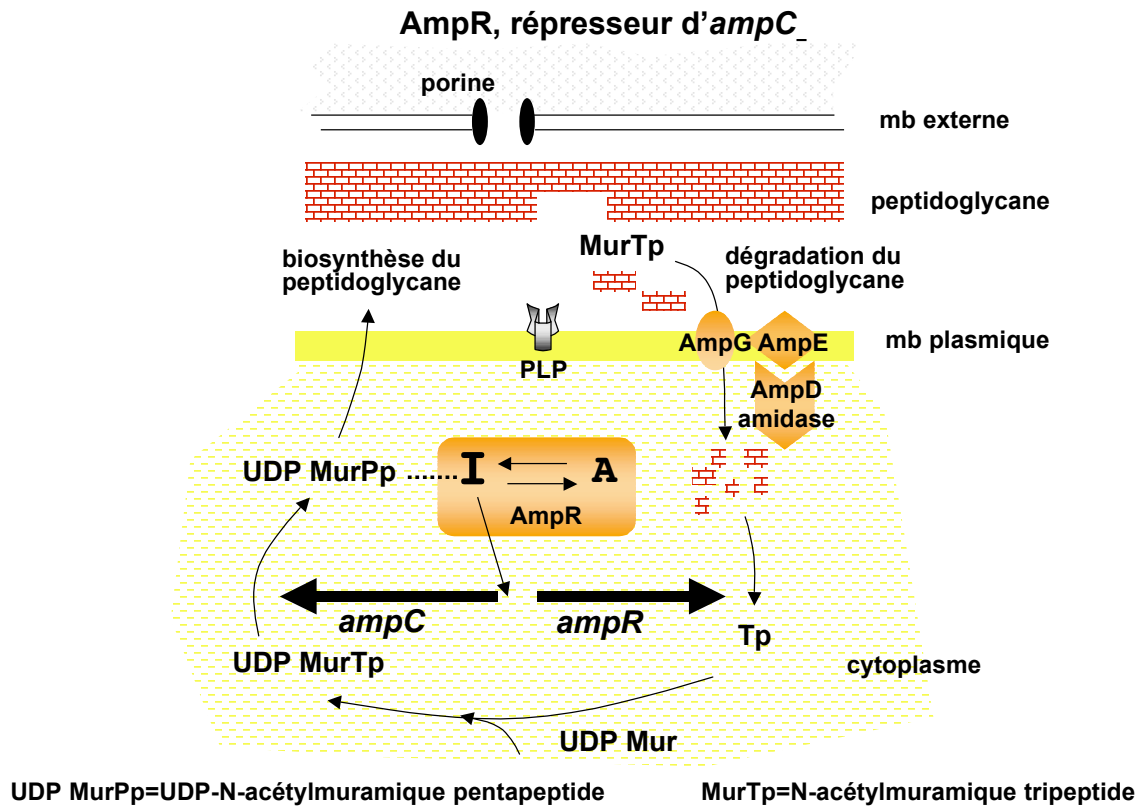
Organisation génétique d'*ampC* : *E. coli* / *C. freundii*



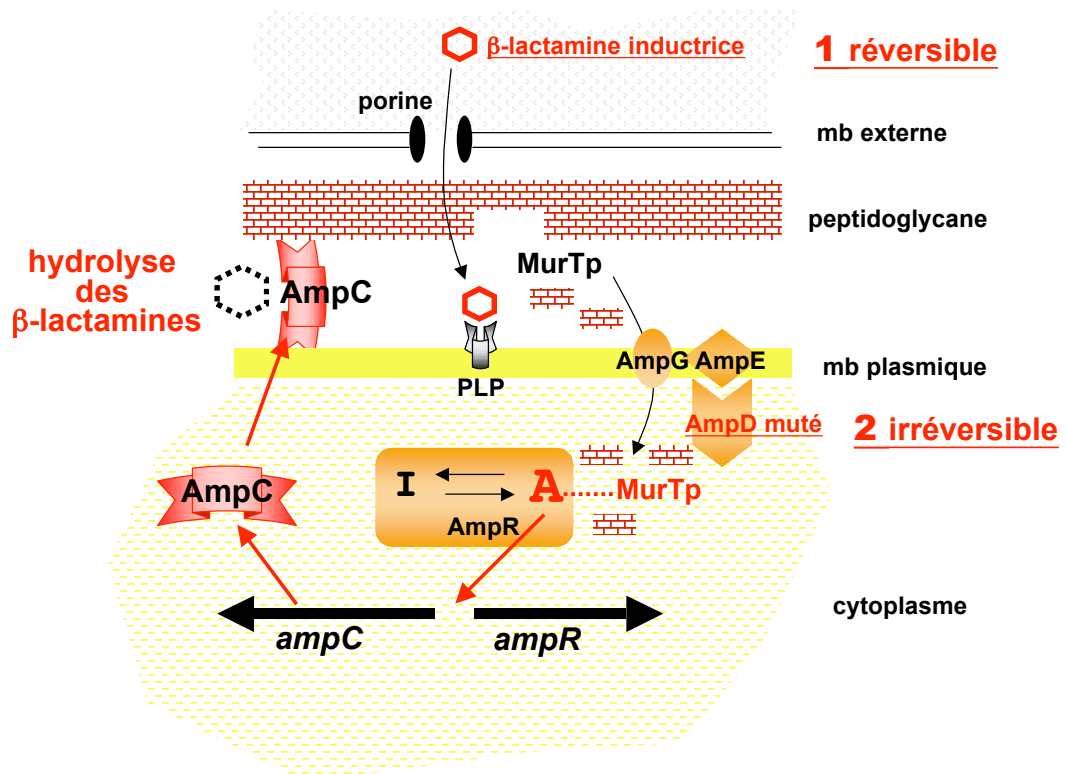
Organisation génétique d'*ampC* comparaison chez plusieurs entérobactéries



Synthèse et dégradation du peptidoglycane : processus dynamique

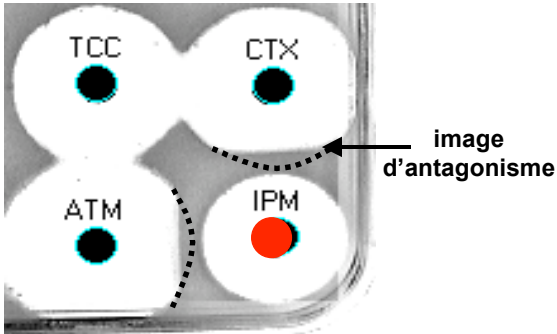


Production d'AmpC : β-lactamine inductrice ou mutation d'*ampD*



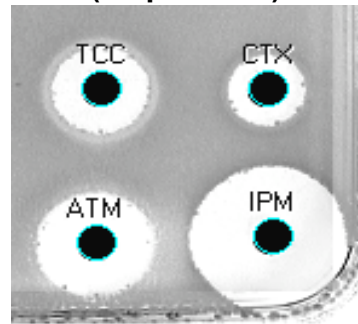
Expression phénotypique d'AmpC

1 induction réversible



E. cloacae
phénotype sauvage

2 dérepression irréversible (ampD muté)



E. cloacae
phénotype déréprimé

● β -lactamine inductrice

Alignement de céphalosporinases d'entérobactéries

```

1  -MFKTTLCALLIT-----ASCSTF---AAP---QQINDIVHRTITPLIEQKIPGMAVAV
2  MMRKSICCALLLT-----ASFSTF---AAKTEQIADIVNRTITPLMQEAIQPMVAI
3  MMRKSICCALLG-----ISCSAL---ATPVSEKLAEVVANTITPLMKAQSVPGMAVAV
4  MMRKSIINTLIFTSIATFFLYTLA---QTKLTQLVATIVNNTLTPLLEKQGIQPMVAI
5  -MTMMNRCAALIAALILPTAAHAQ-----QQIDAVIQPLMEKTVGVPGMAI
6  -MRKMKQNTKLLSVITCLAAATAGGAMAANIDESKIDTVGDLIQPLMKQNNIPGMSVAV
    
```

site actif sérine :

```

1  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
2  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
3  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
4  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
5  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
6  IYQKPPYFTWGYADIAKKQPVTTQTLFELGVSKFTGVLGGDAIARGEIKLSDPTTKY
    
```

S₆₄VSK

```

1  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
2  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
3  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
4  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
5  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
6  WPELTAKQWNGITLLHLATYTAGGLPLQVPDEKSSDRLRFYQNWQPNAPGTQSLYAN
    
```

Y₁₅₀AN

```

1  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
2  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
3  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
4  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
5  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
6  SSIGLFGALAVKPSGLSFEQAMQTRVFQPLKLNHTWINVPFAEKYANGY-REGKAVHV
    
```

```

1  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
2  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
3  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
4  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
5  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
6  SPQGLDAEAYGVKSTIEDMARVQSNLKPDIKERT--LQGGIQLAQSRVWQGMQYQGL
    
```

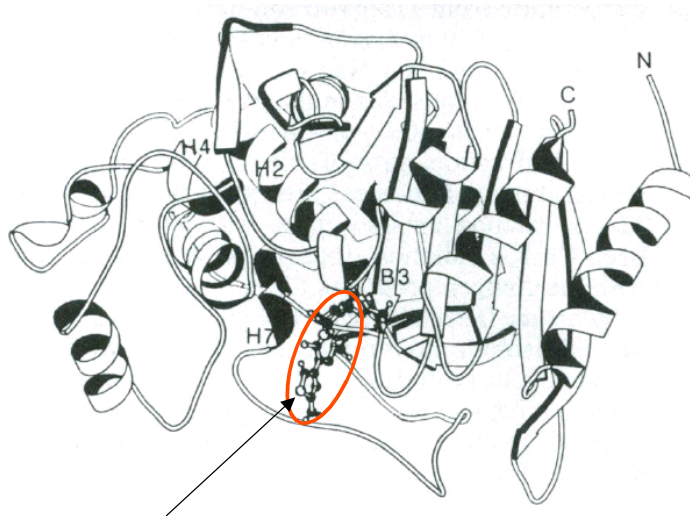
```

1  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
2  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
3  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
4  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
5  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
6  GWEMLDWPVNPDSIINGSDNKIALAARPVKAITPPTPAVRASVWVKTGSGPGSYVAFI
    
```

K₃₁₅TG

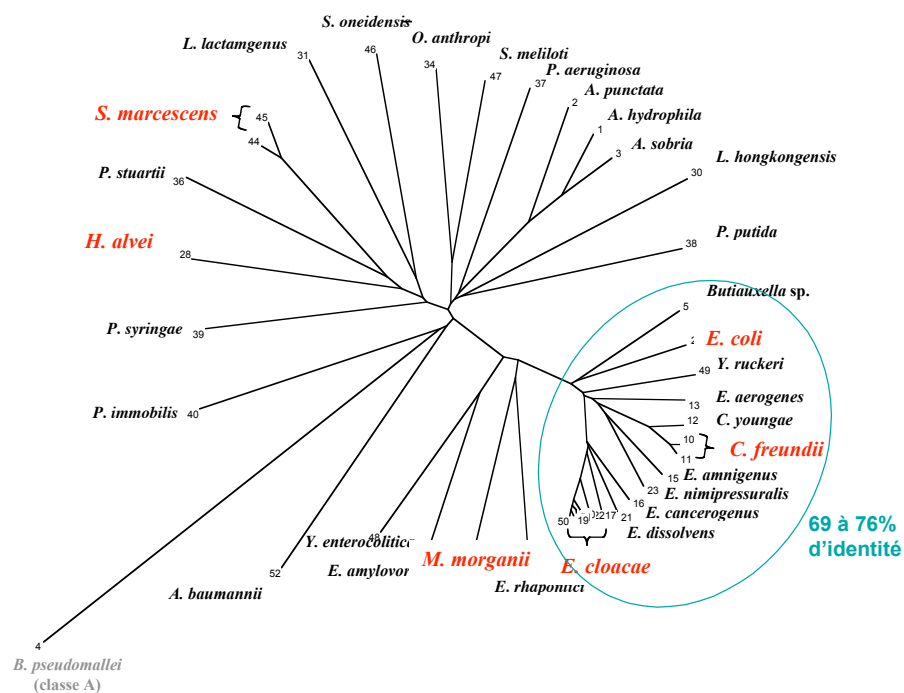
- 1 *E. coli*
- 2 *C. freundii*
- 3 *E. cloacae*
- 4 *Y. enterocolitica*
- 5 *S. marcescens*
- 6 *H. alvei*

Structure tridimensionnelle d'une céphalosporinase

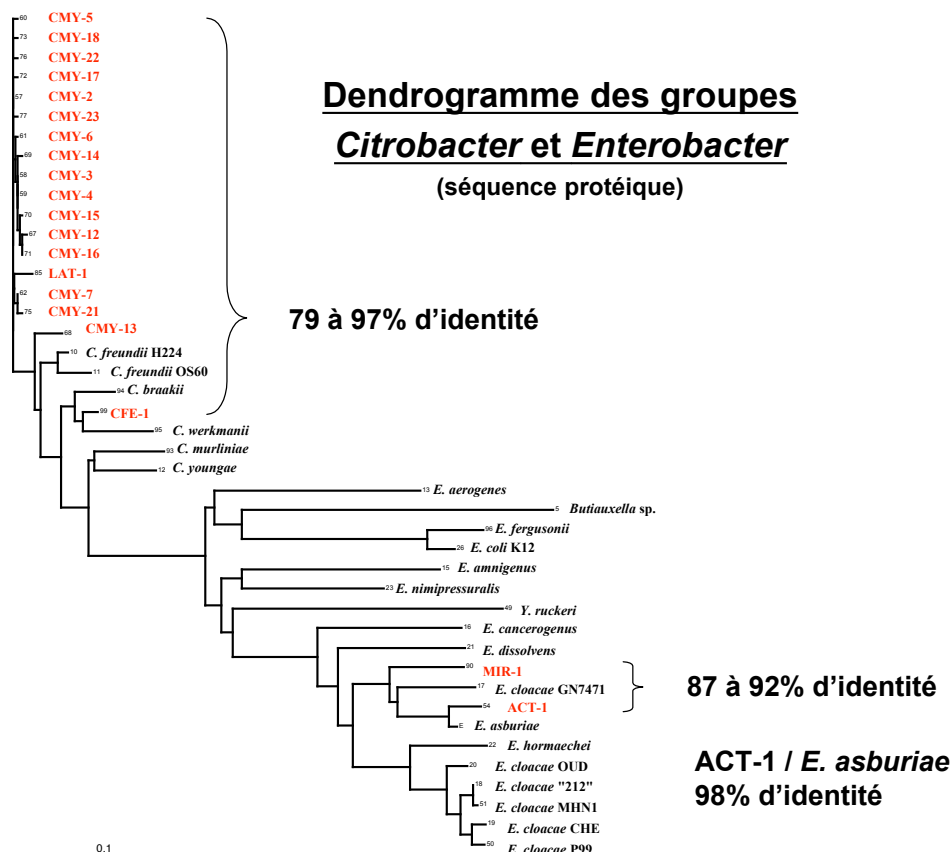
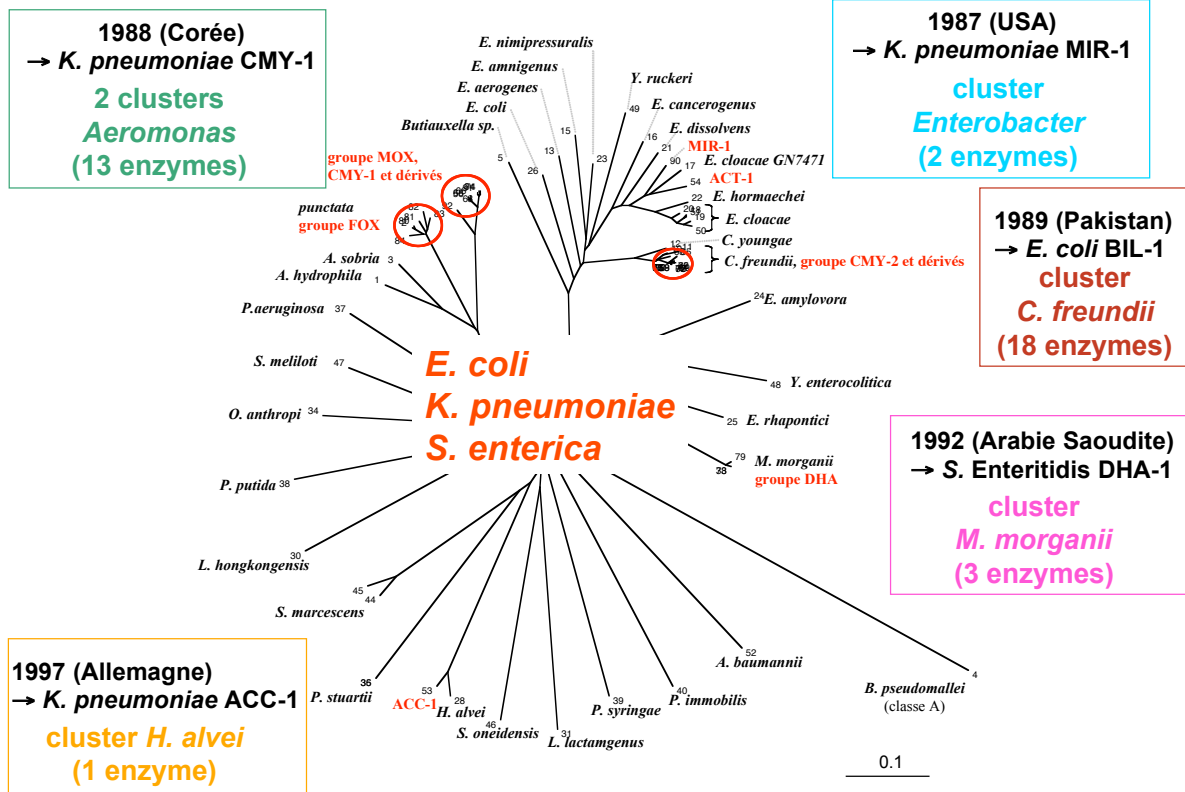


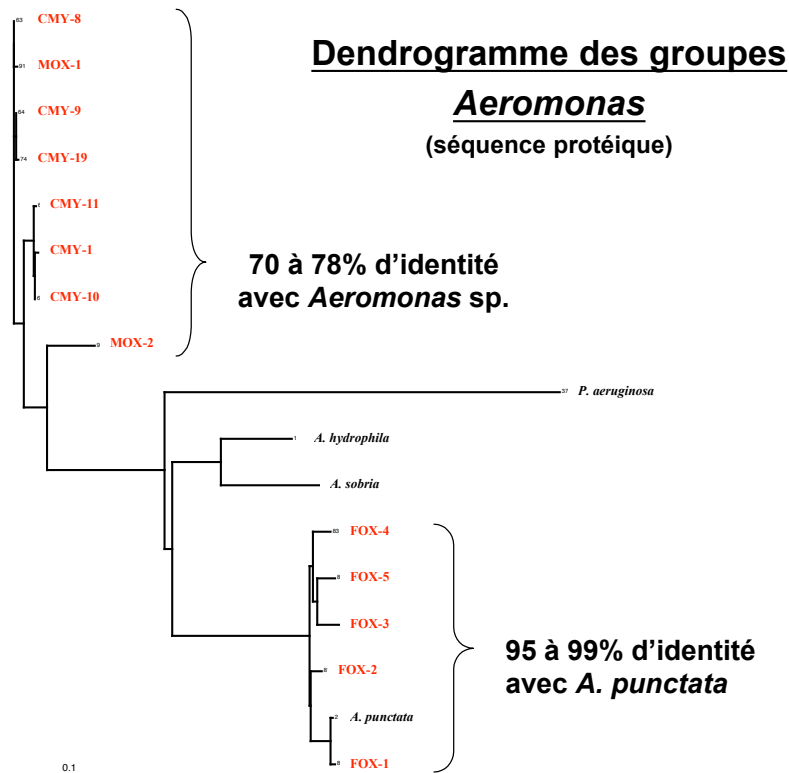
céfotaxime dans la poche catalytique

Phylogénie des céphalosporinases chromosomiques

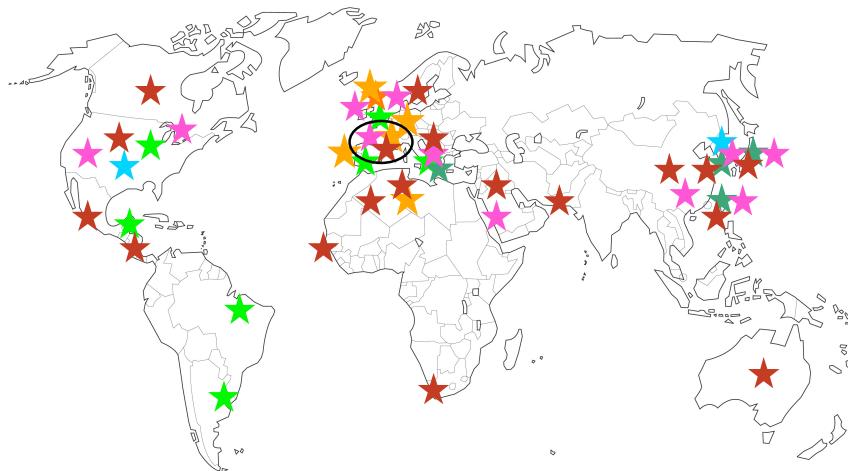


Mobilisation plasmidique des gènes de céphalosporinases



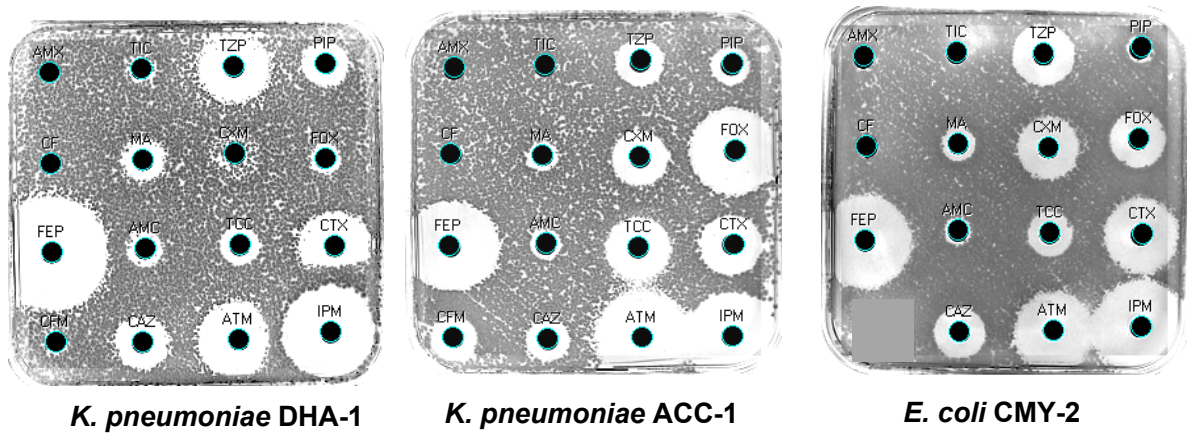


Répartition mondiale des céphalosporinases acquises



- clusters
présents
en France
- cluster *Enterobacter* : ACT-1 et MIR-1
 - cluster *Aeromonas* (FOX et CMY-1-like)
 - cluster *H. alvei* : ACC-1
 - cluster *M. morgani* : DHA-1
 - cluster *C. freundii* : CMY-2-like

Exemples de céphalosporinases acquises détectées en France



La découverte de nouvelles céphalosporinases acquises s'est accélérée ces dernières années...

2002 : 18 enzymes découvertes depuis 1987 (15 ans)
Philippon *et al.* AAC 2002

2007 : 38 enzymes, soit 20 découvertes en 5 ans

... mais on n'a pas découvert de nouveau cluster

Transfert d'information génétique

horizontal → mobilisation d'un gène *ampC* chromosomique
en position plasmidique

vertical → évolution d'*ampC* au sein d'un cluster
par mutations successives

TRAVAIL PERSONNEL

Lutter contre la résistance aux antibiotiques nécessite d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de résistance, et la diffusion des gènes qui en sont le support

Souches AmpC plasmidique isolées en région parisienne

parmi les 3 clusters existant en France :

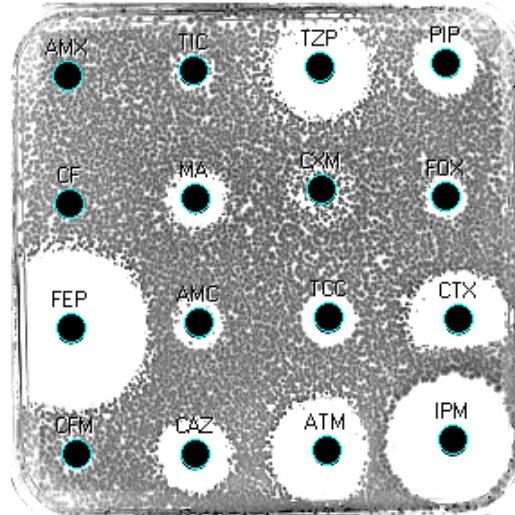
- *M. morganii* : 12 souches productrices de **DHA-1**
- *H. alvei* : 14 souches productrices de **ACC-1**
- *C. freundii* : 15 souches productrices de **CMY-2** et **CMY-4**

Objectifs :

- décrire les liens épidémiologiques entre souches d'un même cluster
- décrire l'organisation génétique d'*ampC*
 - Identifier l'élément génétique mobilisateur d'*ampC* responsable du transfert horizontal
 - caractériser le mode d'expression d'*ampC*

cluster *M. morganii*

Souches productrices de l'enzyme DHA-1



Ex : *K. pneumoniae* STA2DHA

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Jan. 2000, p. 222-225
0066-4804/00/\$04.00+0
Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 44, No. 1

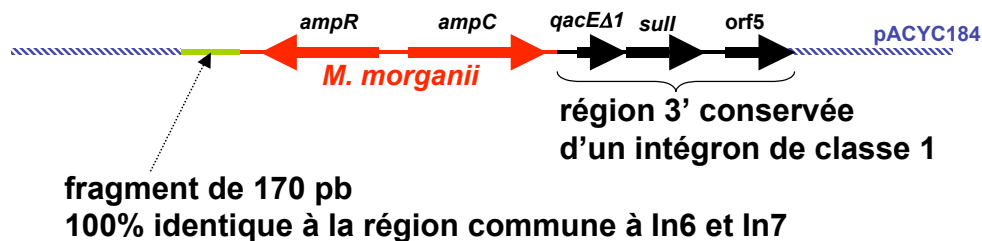
A Novel Integron in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, Carrying the *bla*_{DHA-1} Gene and Its Regulator Gene *ampR*, Originated from *Morganella morganii*

CHARLOTTE VERDET,^{1*} GUILLAUME ARLET,¹ GUILÈNE BARNAUD,²
PHILIPPE H. LAGRANGE,³ AND ALAIN PHILIPPON⁴

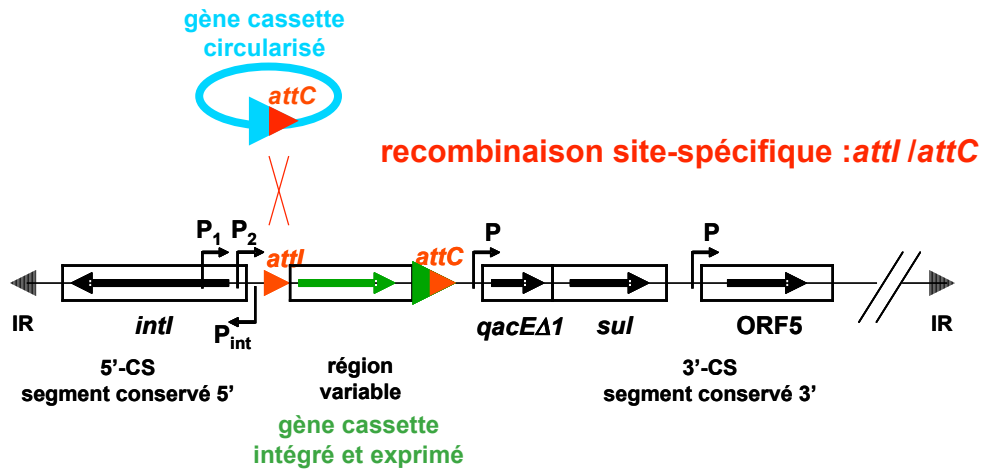
¹Service de Bactériologie, Hôpital Tenon, ²Service de Bactériologie, Hôpital Lariboisière, ³Service de Microbiologie, Hôpital St. Louis, ⁴and Service de Bactériologie, Hôpital Cochin, Paris, France

Received 23 February 1999/Returned for modification 31 May 1999/Accepted 9 October 1999

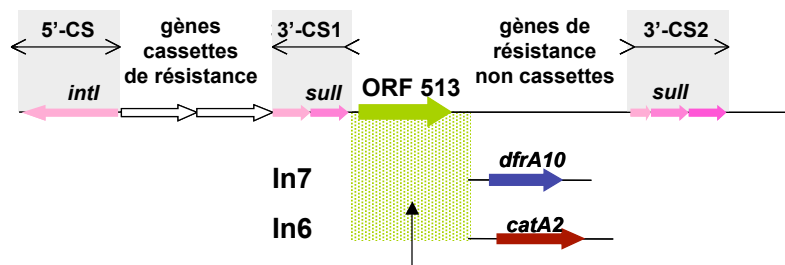
Souche *S. enterica* serovar Enteritidis KF92 (Arabie Saoudite) produisant une AmpC inducible codée sur le plasmide pSAL-1
Clonage dans pACYC184 → plasmide recombinant de 2,4 kb



Structure des intégrons de classe 1

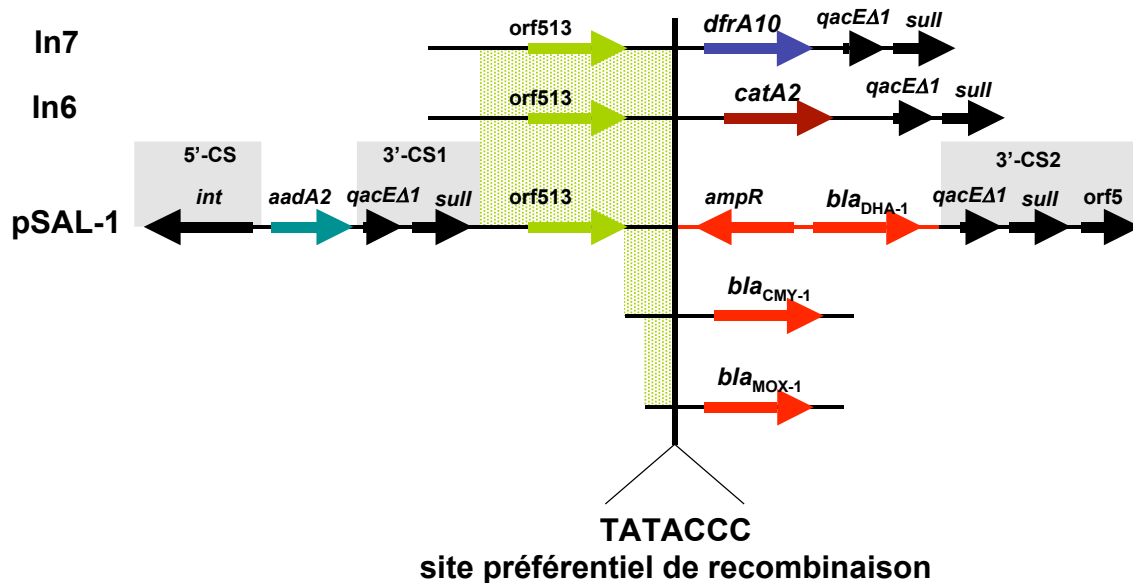


Structure des intégrons complexes



région de 2,1 kb
dite "commune à In6 et In7"
orf513 codant une protéine de 513 acides aminés
= hypothétique recombinase

Organisation génétique du plasmide pSAL-1 portant *bla*_{DHA-1}



Définition d'une nouvelle entité génétique : ISCR1

- La région commune à In6 et In7 de 2,1 kb a été nommée **CR1** par Partridge et Hall (AAC 2003)
- Présence de CR1 sur différents supports (plasmide et chromosome) en amont de différents gènes de résistance (+/- apport de promoteur) :

<i>catA2</i>	→ R ^{ce} chloramphénicol
<i>dfr</i>	→ R ^{ce} triméthoprim
<i>qnrA</i>	→ R ^{ce} quinolones
<i>armA</i>	→ R ^{ce} aminosides
<i>ampC</i>	→ β-lactamases de classe C
<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{VEB-3} , <i>bla</i> _{PER-3}	→ β-lactamases de classe A

→ **CR1 = élément transposable ?**

Revue récente de Toleman (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006)

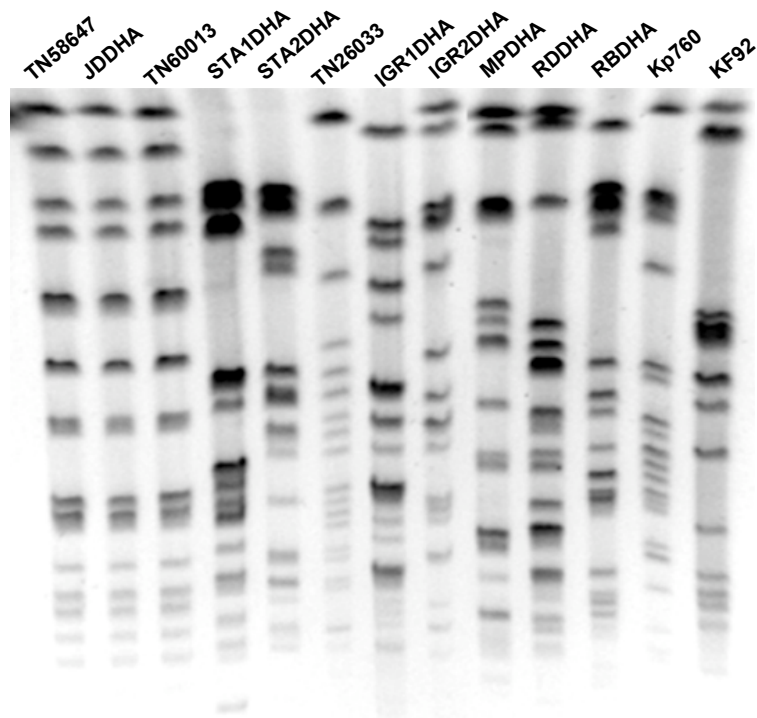
→ **ISCR1**

structure apparentée à la famille IS91

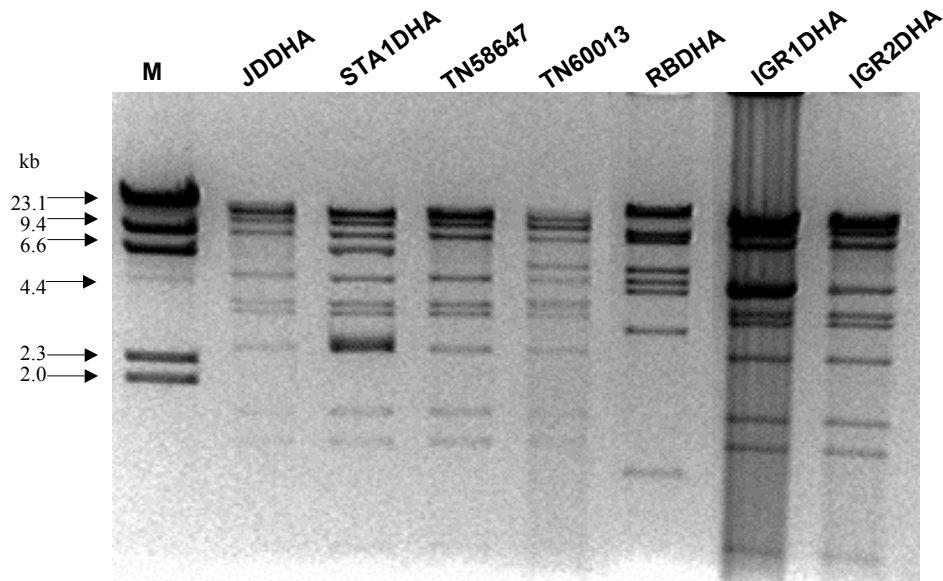
12 souches de *Klebsiella* sp. productrices de DHA-1

souche	année	hôpital	TEM	SHV
Kp 760	1998	Rothschild	-	-
Kp TN58647	1999	Tenon	TEM-1	SHV-2a
Kp RDDHA	1999	R. Debré	-	SHV-2
Kp RBDHA	2002	R. Ballanger	-	-
Kp JDDHA	2002	Joffre-Dupuytren	TEM-1	SHV-2a
Ko MPDHA	2002	Massy-Palaiseau	TEM-1	-
Kp TN60013	2002	Tenon	TEM-1	SHV-2a
Kp STA1DHA	2003	St Antoine	-	-
Kp TN26033	2003	Tenon	-	-
Kp STA2DHA	2003	St Antoine	-	-
Kp IGR1DHA	2003	IGR	-	-
Kp IGR2DHA	2003	IGR	-	-

Electrophorèse en champ pulsé (digestion XbaI)



Profil de restriction plasmidique EcoRI



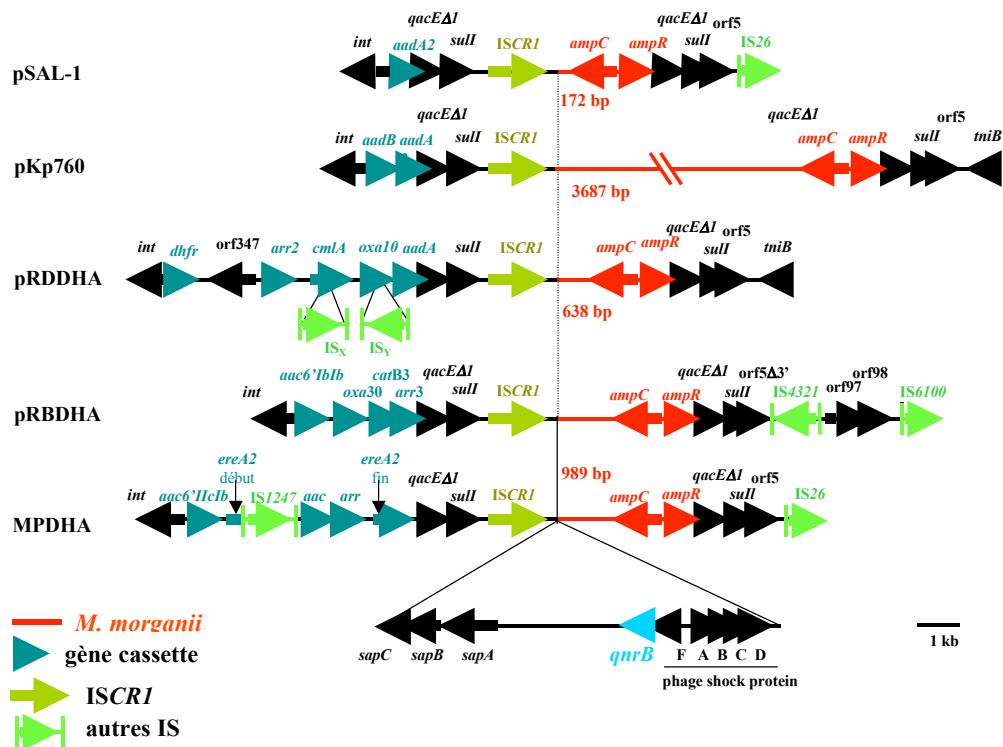
M, marqueur de poids moléculaire

12 souches de *Klebsiella* sp. productrices de DHA-1

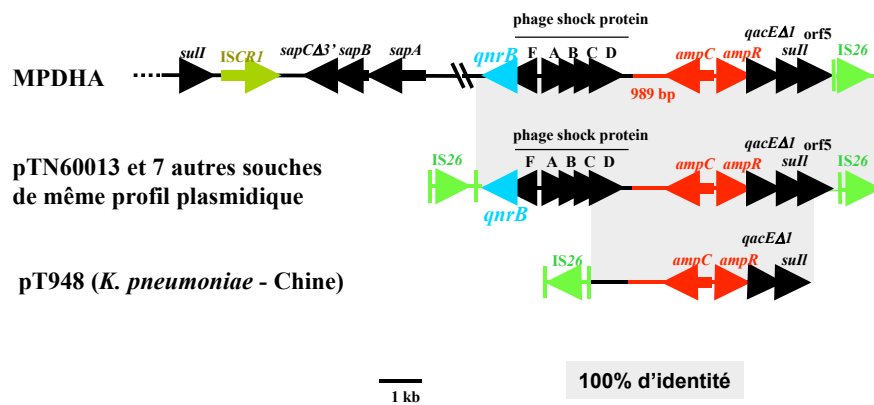
souche	année	hôpital	TEM	SHV	PFGE	Plasmid fingerprint	orf513
Kp 760	1998	Rothschild	-	-	I		+
Kp TN58647	1999	Tenon	TEM-1	SHV-2a	A	1a	-
Kp RDDHA	1999	R. Debré	-	SHV-2	G		+
Kp RBDHA	2002	R. Ballanger	-	-	H	2	+
Kp JDDHA	2002	Joffre-Dupuytren	TEM-1	SHV-2a	A	1a	-
Ko MPDHA	2002	Massy-Palaiseau	TEM-1	-		NT	+
Kp TN60013	2002	Tenon	TEM-1	SHV-2a	A	1c	-
Kp STA1DHA	2003	St Antoine	-	-	B	1b	-
Kp TN26033	2003	Tenon	-	-	D	NT	-
Kp STA2DHA	2003	St Antoine	-	-	C	1a	-
Kp IGR1DHA	2003	IGR	-	-	E	1a	-
Kp IGR2DHA	2003	IGR	-	-	F	1a	-

NT : non transférable

Organisation génétique de *bla*_{DHA-1} : souches orf513 +



Organisation génétique de *bla*_{DHA-1} chez les souches orf513 - dérivée d'un intégron complexe



Mobilisation de *ampC/ampR* à partir de *M. morganii*

4 événements génétiques indépendants liés à **ISCR1** au sein d'un intégron complexe

→ **5 souches** seulement : chaque structure est rare

événements génétiques ultérieurs liés à **IS26** (délétion ISCR1)

1 en France → **8 souches** ayant le même plasmide

1 en Chine → **1 souche**

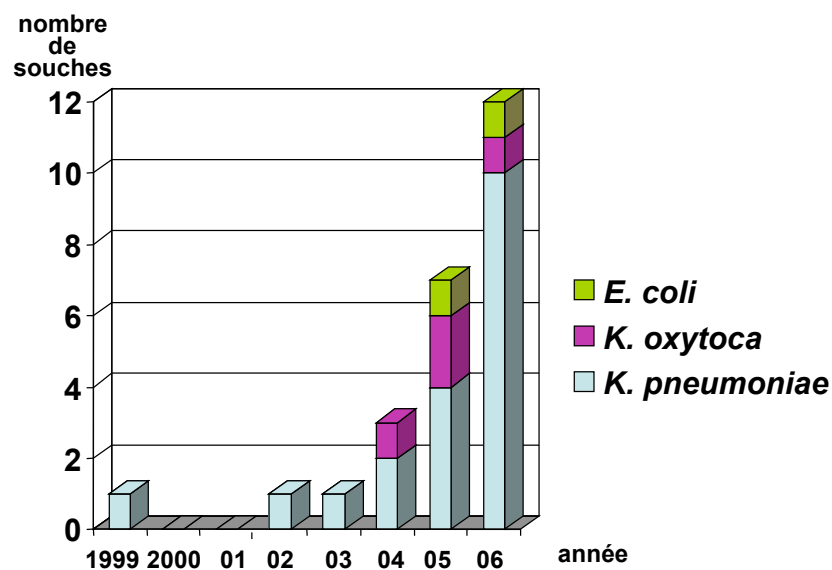
**Rôle d'IS26 dans la stabilisation de la structure
sur un plasmide diffusible?**

Sous forme de transposon composite?

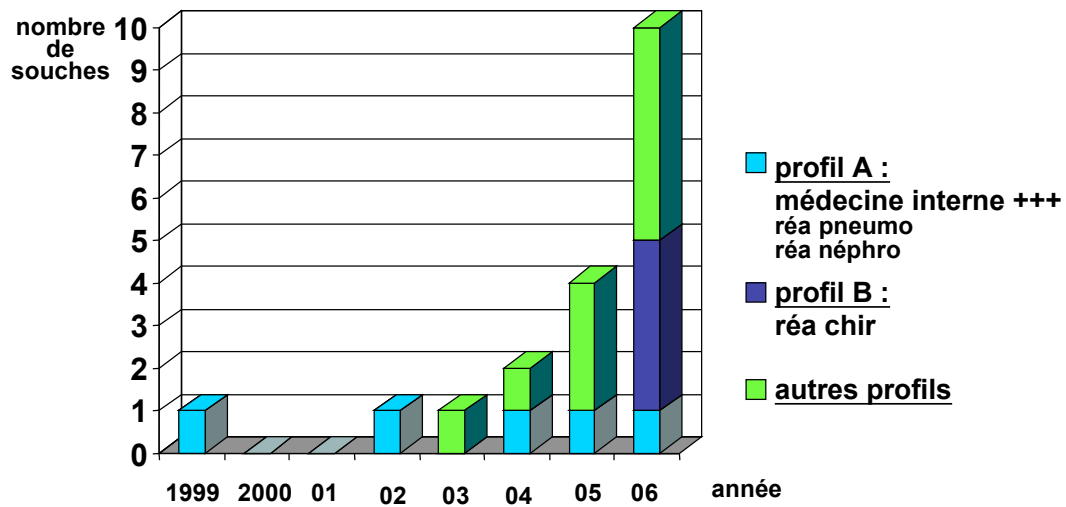
25 souches d'entérobactéries DHA-1 isolées à l'hôpital Tenon

Infections : ECBU, poumons, hémoculture, KT

25 patients répartis dans 11 services

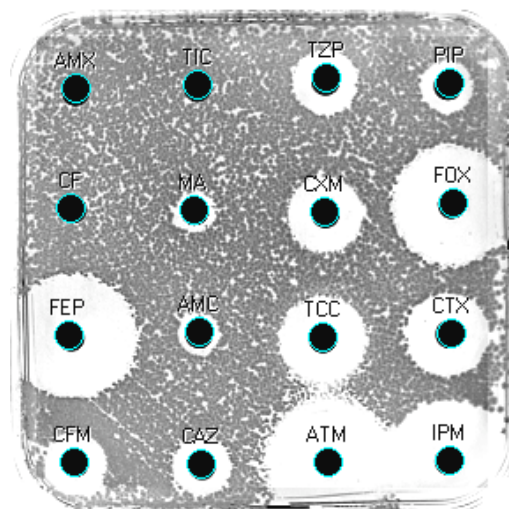


19 souches *K. pneumoniae* DHA-1 analysées par ERIC-PCR



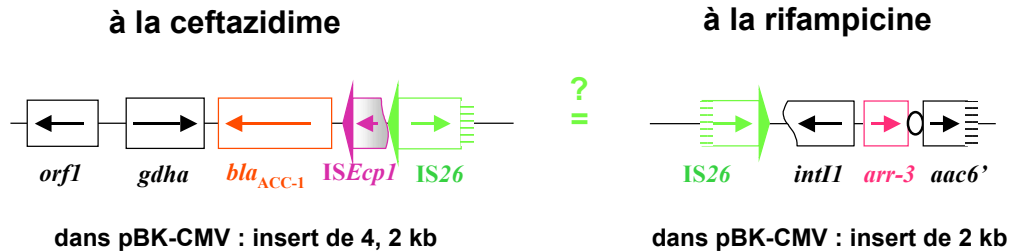
souches *orf513* - *qnrB* +
→ toutes ont probablement la même organisation génétique
que le plasmide pTN60013

Cluster *H. alvei* souches productrices de l'enzyme ACC-1



Ex : *K. pneumoniae* KUS

Souche *K. pneumoniae* SLK54
clonage de la résistance



ISEcp1 : transposition à une seule extrémité

ISEcp1 = séquence d'insertion particulière

- deux **IRs** de 14 pb **imparfaites**
- séquence-cible **non spécifique**, riche en AT : duplication de 5 pb
- **mobilisation** d'une grande séquence adjacente (< 5 kb)
par reconnaissance d'une IR_R variable

Fréquemment retrouvée en amont de *bla*_{CTXM} :

- **mobilisation** de *bla*_{CTX-M} à partir du chromosome de *Kluyvera* sp.
- apport de **séquences promotrices** -10 et -35 pour l'expression de l'enzyme à haut niveau

14 souches d'entérobactéries productrices de ACC-1 (11 *K. pneumoniae*, 2 *S. enterica*, 1 *P. mirabilis*)

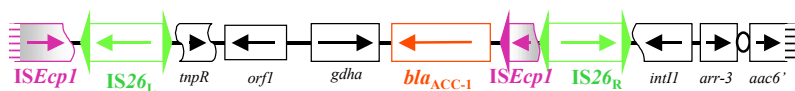
souches	année	origine	PFGE	plasmid fingerprint	
Kp KUS	1997	Allemagne	D	C	◆
Kp C5900	1997	Tunisie	C	A	◆
Kp SLK54	1998	H ^{al} S ^t Louis	A1	A	★
Kp SLK55	1998	H ^{al} S ^t Louis	A1	A	◆
Kp SLK56	1998	H ^{al} S ^t Louis	A1	A	★
Kp RP2	1999	H ^{al} R. Poincaré	B2	A	★
Kp RP4	1999	H ^{al} R. Poincaré	B3	A	★
Kp RP6	1999	H ^{al} R. Poincaré	A1	A	★
Kp RP22	1999	H ^{al} R. Poincaré	B3	A	★
Kp RP27	1999	H ^{al} R. Poincaré	A2	A	★
Kp VIL	2000	H ^{al} S ^t Antoine	B1	A	★
Pm SLP57	1999	H ^{al} S ^t Louis	ND	A	★
S. Mbandaka MMAS40	1999	Tunisie	ND	B	◆
S. Livingstone B952	2000	Tunisie	ND	D	◆

ND = non déterminé

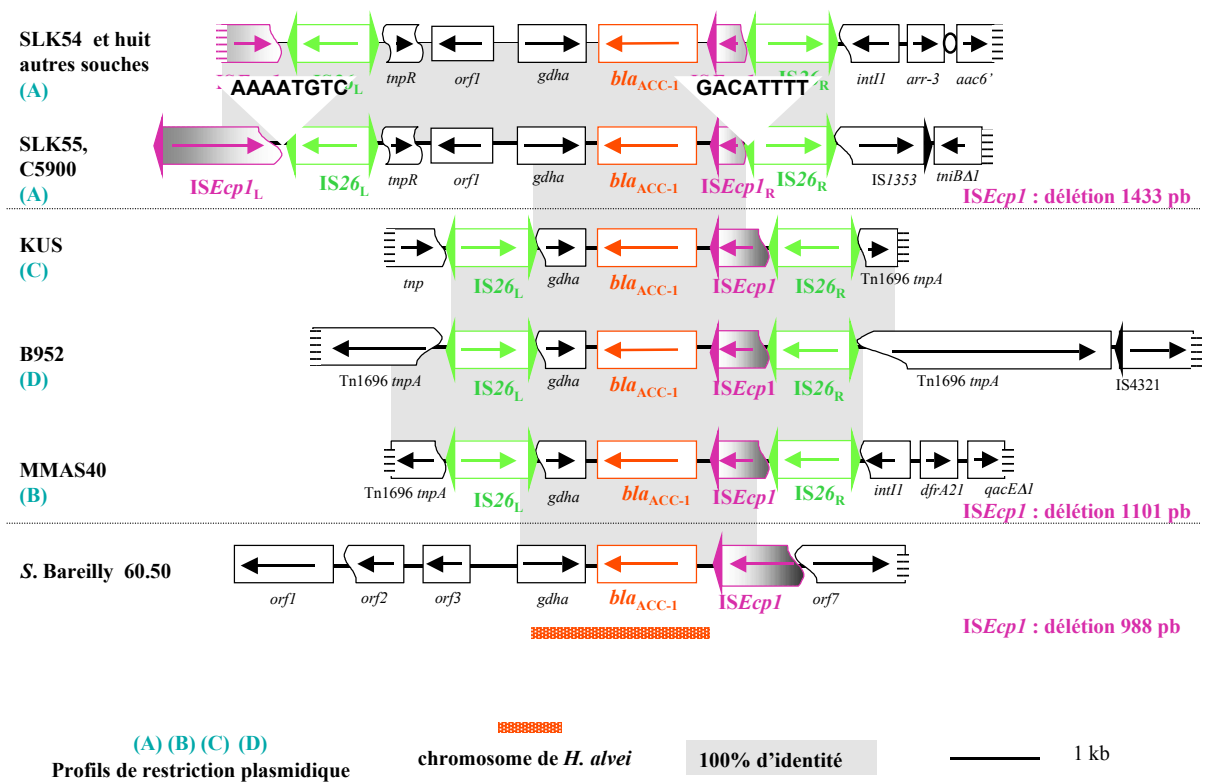
Etude de l'organisation génétique par PCR mapping ★
ou par clonage ◆

Organisation génétique de *bla*_{ACC-1}

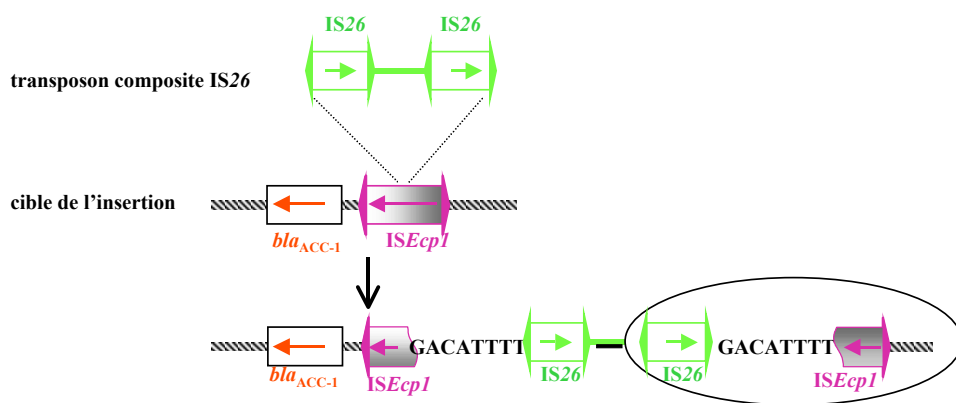
SLK54 et huit
autres souches
(A)



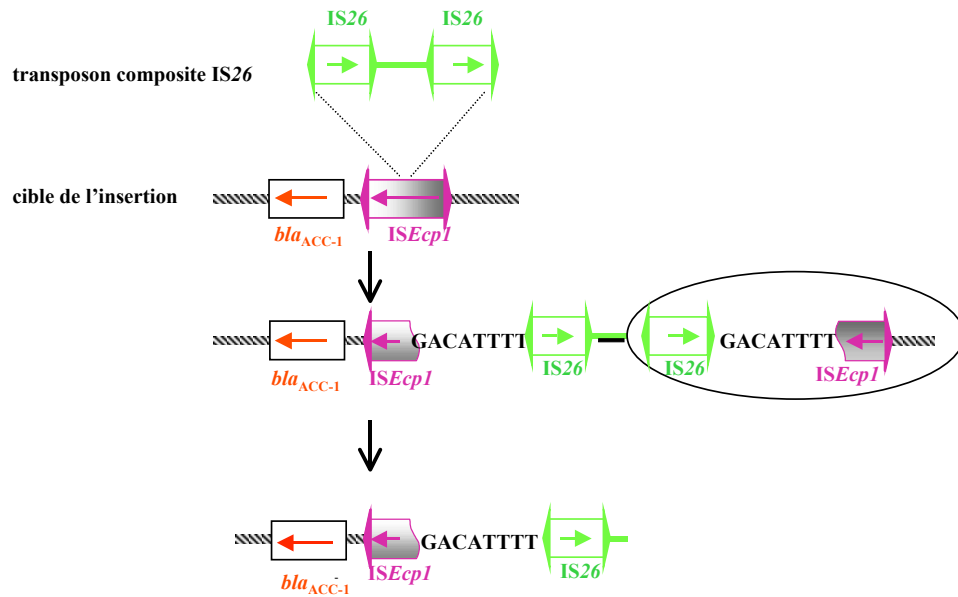
Organisation génétique de *bla*_{ACC-1}



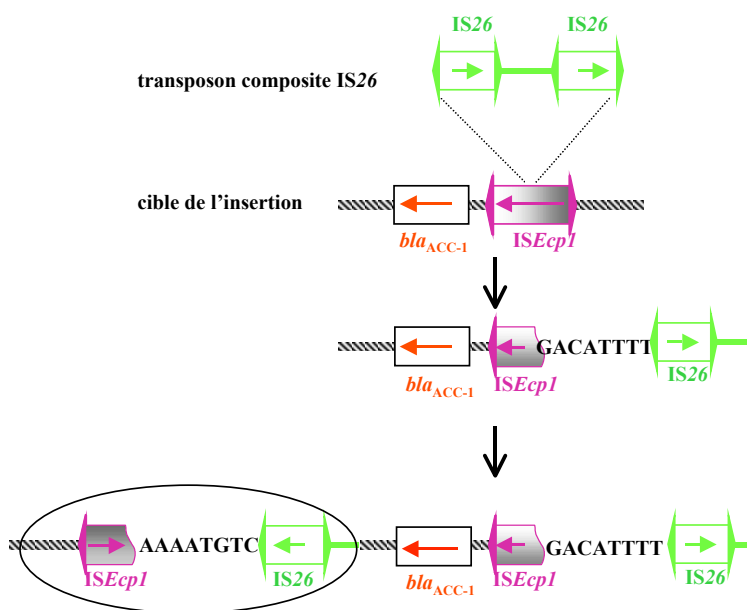
Hypothèse : insertion d'un transposon composite IS26



Hypothèse : insertion d'un transposon composite IS26



Hypothèse : insertion d'un transposon composite IS26



Mobilisation de *ampC* à partir de *H. alvei*

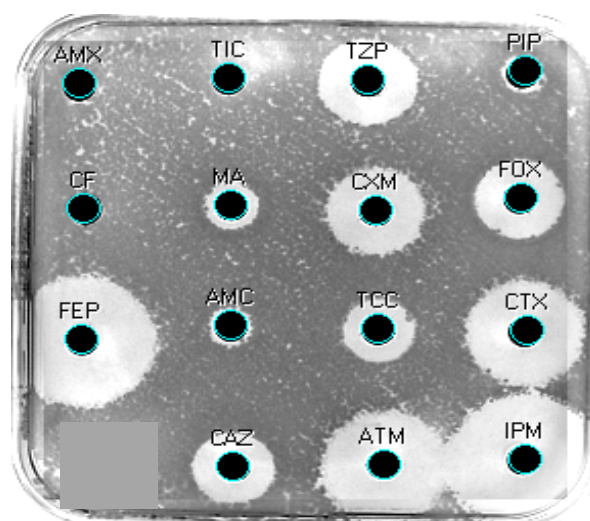
Un événement génétique unique lié à *ISEcp1*
avec apport de séquences promotrices
puis

Trois événements génétiques indépendants
entraînant la délétion de *ISEcp1*
implication de *IS26* à 2 reprises

Rôle d'*IS26* dans la stabilisation de la structure
sur un plasmide diffusible?

Cluster *C. freundii*

Souches productrices d'enzymes CMY-2-like



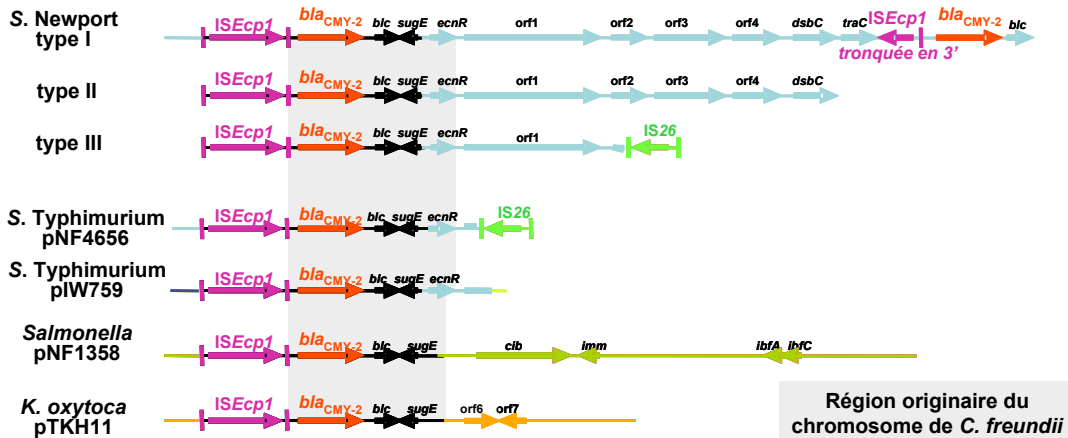
Ex : *E. coli* TN44889

Plasmides *bla*_{CMY-2} décrits dans la littérature (1)

Etudes américaines et européennes

Souches de *Salmonella* et *E. coli*, chez l'homme et l'animal

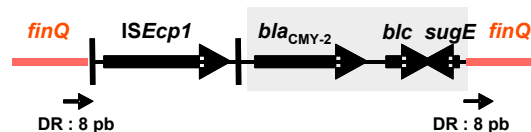
- restriction plasmidique → diffusion de 2 plasmides différents (35 souches)
- typage de réplicons → 2 groupes de plasmides : A/C et I1 (26 souches)
- mixed-plasmid microarray → 2 variants plasmidiques (14 souches)



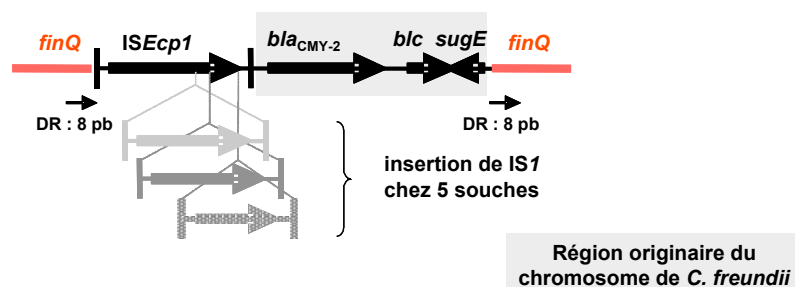
Plasmides *bla*_{CMY-2} décrits dans la littérature (2)

Etudes taiwanaises

S. enterica serovar Choleraesuis : transposon dans le gène plasmidique *finQ*



34 souches cliniques d'entérobactéries CMY-2 + (10 espèces différentes)



15 souches d'entérobactéries productrices d'enzymes CMY-2-like (4 *K. pneumoniae*, 8 *E. coli*, 1 *S. enterica*, 2 *P. mirabilis*)

souches	année	origine	profil ERIC profil REP	replicon -type	Type CMY
Kp BM2974	1998	Suède	W	A/C	CMY-4
Kp 9701	1997	H ^{al} Cochin	X	A/C	CMY-4
Kp 169	1999	H ^{al} S ^t Antoine	Y	A/C	CMY-2
Kp LMCMY		H ^{al} L. Mourier	Z	A/C	CMY-2
Ec TN2106	2003	H ^{al} Tenon	A	A/C	CMY-2
Ec TN44889	2004	H ^{al} Tenon	C	ND	CMY-2
Ec TN13	2002	H ^{al} Tenon	B1	I1	CMY-2
Ec TN10	2002	H ^{al} Tenon	B2	I1	CMY-2
Ec TN38148	2004	H ^{al} Tenon	A	I1	CMY-2
Ec TN386	2002	H ^{al} Tenon	A	I1	CMY-2
Ec IGR4801	2005	IGR	B3	-	CMY-2
Ec IGR4872	2005	IGR	D	-	CMY-2
<i>S. Senftenberg</i> SENF	1994	Algérie	ND	A/C	CMY-2
Pm H223b	1996	Tunisie	ND	A/C	CMY-4
Pm RPCMY	2002	H ^{al} R. Poincaré	ND	-	CMY-2

ND : non déterminé

Organisation génétique de *bla*_{CMY-2}

réplicon
type

S. enterica Newport

A/C Kp169, BM2974, LMCMY
SENF, H223b

A/C TN2106

A/C Kp9701

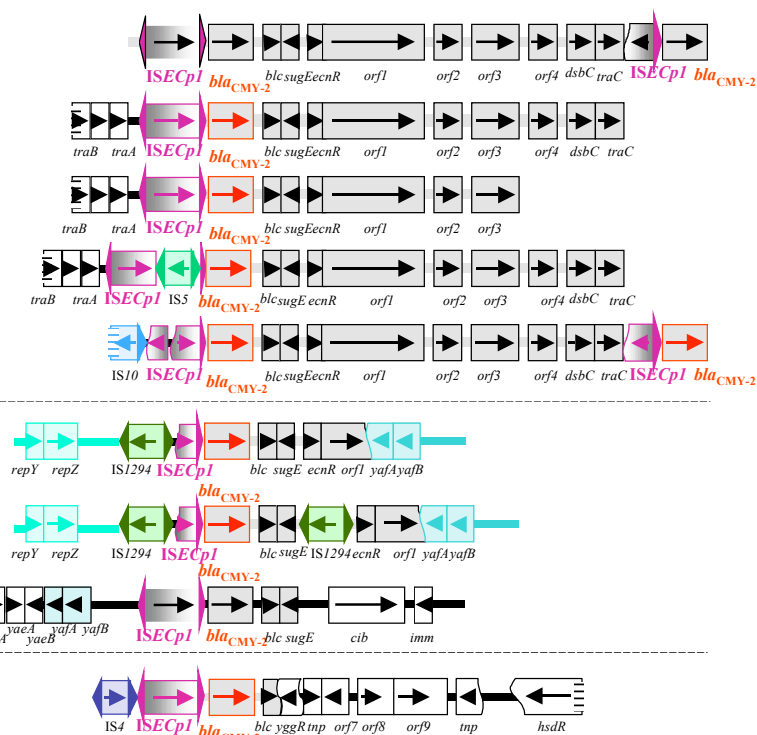
neg RPCMY

I1 TN38148, TN10, TN13
TN386, IGR4801

neg IGR4872

S. enterica
pNF1358

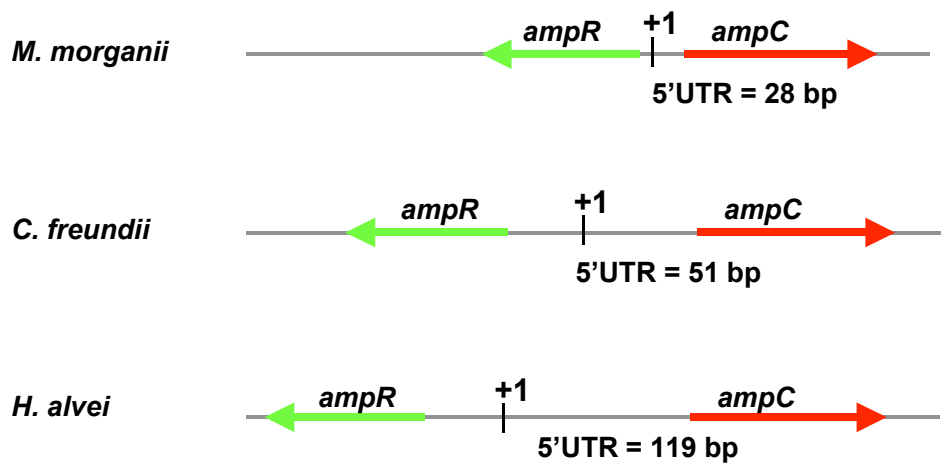
TN44889



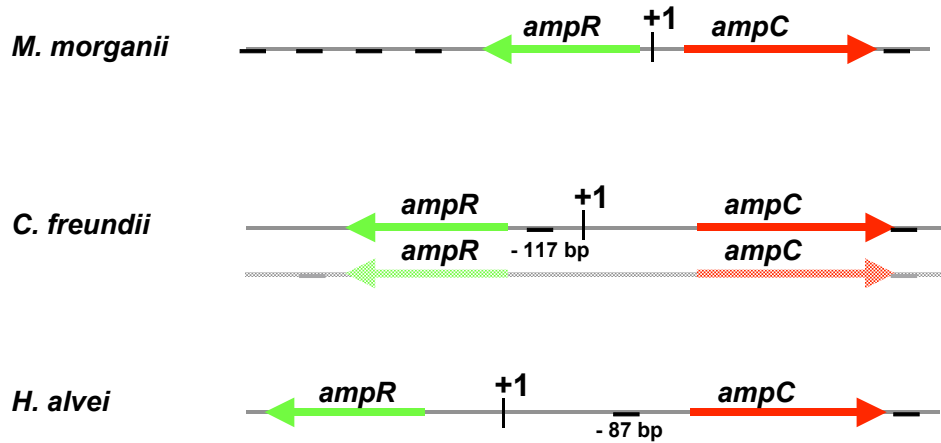
100% d'identité

Conclusions et perspectives

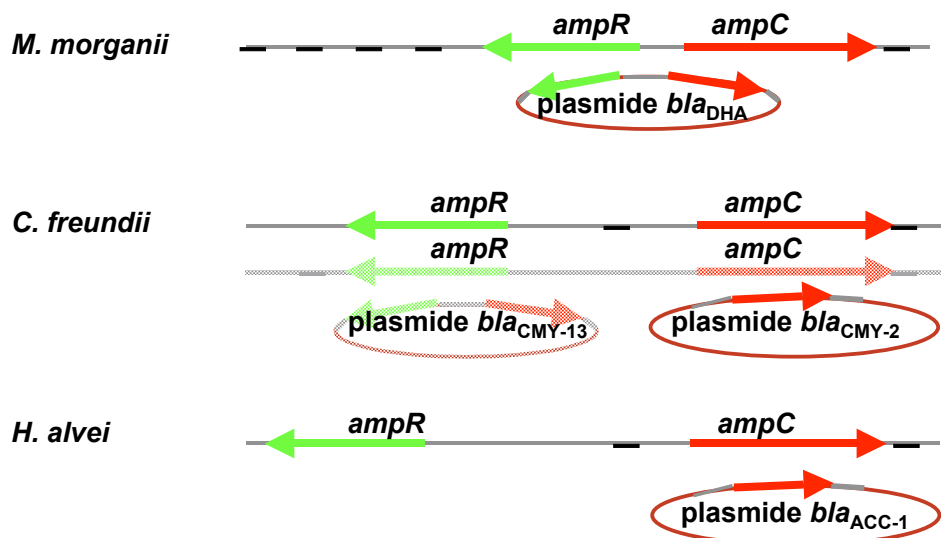
Selon l'origine chromosomique d'*ampC* :
régions intercistroniques de différentes longueurs



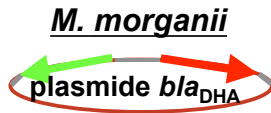
Hypothèse : la probabilité de couper entre *ampC* et *ampR* est proportionnelle à la longueur de la région intercistronique



cluster <i>M. morganii</i> : mobilisation de <i>ampC/ampR</i>			
“	<i>C. freundii</i>	:	“ <i>ampC/ampR</i> ou <i>ampC</i> seul
“	<i>H. alvei</i>	:	“ <i>ampC</i> seul



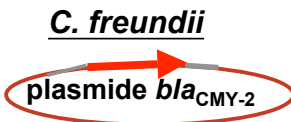
Plusieurs événements successifs de transposition



ISCR1 = élément mobilisateur (→ 4 événements)

pas d'apport de séquences promotrices

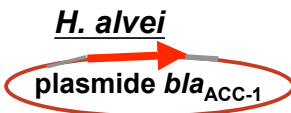
IS26 = élément "stabilisateur" (→ 1 événement en F)



ISEcp1 = élément mobilisateur (→ 1 événement)

apport de séquences promotrices

IS5, IS10, IS1294 → multiples délétions d'**ISEcp1**

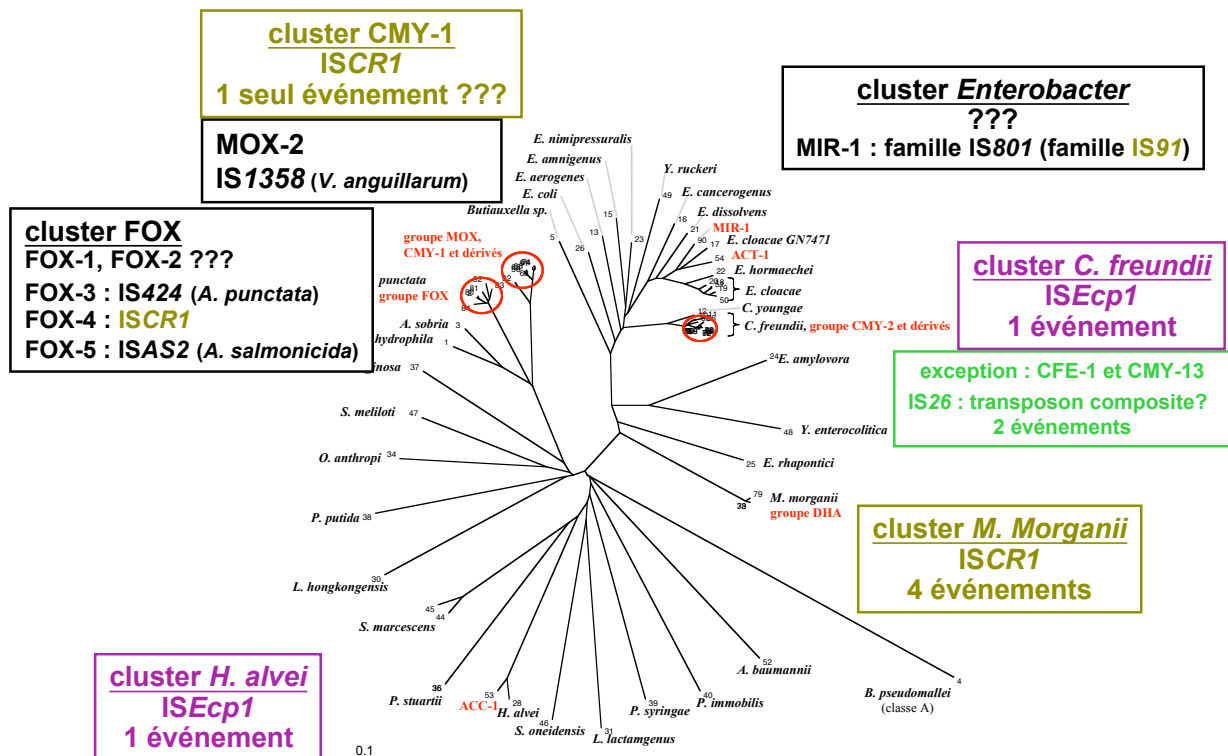


ISEcp1 = élément mobilisateur (→ 1 événement)

apport de séquences promotrices

IS26 = élément "stabilisateur" (→ 2 événements)

Transposition des gènes de céphalosporinases



Epidémiologie des β -lactamases plasmidiques de classe A et C

Depuis 10 ans, émergence mondiale des BLSEs de type CTX-M :

- en milieu communautaire, chez des patients sans facteur de risque
- mobilisation de bla_{CTX-M} à partir du chromosome de diverses espèces de *Kluyvera*
- plusieurs événements de transposition : **ISEcp1** et **ISCR1**

L'émergence simultanée des enzymes CTX-M et des céphalosporinases acquises est-elle liée à l'existence d'un réservoir commun des structures mobilisatrices : ISEcp1 et ISCR1?

Encore beaucoup de questions...

Quel est le réservoir de ISEcp1 et ISCR1?

- la flore digestive de l'homme ou de l'animal?
- les bactéries du sol?
- les bactéries de l'eau?

Où ont lieu les événements de transposition?

- dans le tube digestif des patients hospitalisés?
- dans le tube digestif des animaux d'élevage?
- dans les eaux d'effluents d'activités hospitalières ou vétérinaires?

➡ Nécessité d'élargir les investigations épidémiologiques aux bactéries de l'environnement et en milieu vétérinaire