

Etude de l'expression d'AmpC dans *Enterobacter cloacae* : absence de risque d'induction avec l'inhibiteur de β -lactamases NXL104

Contact Information
info@novexel.com

M. Claudon, M.T. Black, D. Platel, J.E. Hodgson et C. Miossec
NOVEXEL S.A., Romainville, France



INTRODUCTION

Chez les bactéries à Gram négatif, le mécanisme majeur de résistance aux β -lactamines est la production de β -lactamases, enzymes capables de dégrader le noyau β -lactame.

Certaines espèces bactériennes, dont *Enterobacter*, *Citrobacter* et *P. aeruginosa*, possèdent un gène chromosomique codant pour une céphalosporinase de type AmpC. L'expression du gène *ampC* peut être induite de façon transitoire par certaines β -lactamines, et ainsi conduire à la résistance de la souche bactérienne ; les carbapénèmes et les céphamycines ont en général le plus fort potentiel inducteur (1). L'induction d'AmpC ne conduit pas nécessairement à un échec thérapeutique, notamment quand l'antibiotique exerce une activité bactéricide rapide. Toutefois, le potentiel à induire AmpC doit être soigneusement évalué lorsqu'il s'agit d'un inhibiteur de β -lactamases, car l'expression transitoire de cette céphalosporinase peut antagoniser l'activité antibactérienne de la β -lactamine associée (2). En effet, une β -lactamine donnée, substrat des céphalosporinases, conservera son activité antibactérienne à condition d'avoir un faible pouvoir d'induction d'AmpC ; en revanche, son activité serait compromise si elle était associée à un inhibiteur de β -lactamases capable d'induire une production significative d'AmpC.

Le composé NXL104 est issu d'une nouvelle série chimique distincte des β -lactamines (Figure 1) : il est capable d'inhiber les β -lactamases de classe A et de classe C. NXL104 n'a pas d'activité antibactérienne intrinsèque ; en revanche, il protège efficacement les β -lactamines de l'hydrolyse par les β -lactamases dans des souches productrices d'enzymes de classe A ou de classe C.

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel de NXL104 à induire l'expression d'AmpC chez *Enterobacter cloacae*. Du fait de la stabilité considérable du complexe β -lactamase / NXL104 (1/2 vie de l'ordre de 7 jours pour AmpC P99), il n'était pas possible d'estimer l'induction d'AmpC en mesurant directement l'activité β -lactamase dans les cellules traitées par NXL104 ; le potentiel inducteur de NXL104 a donc été évalué par quantification des ARNm *ampC*.

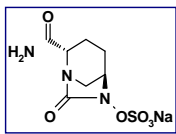


Figure 1 : Structure chimique du NXL104

METHODOLOGIE

Souches bactériennes et conditions d'induction

Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées selon les méthodes CLSI. Pour les études d'induction, les cellules en phase de croissance semi-log sont incubées jusqu'à 6 heures en présence de céfoxitine (FOX) à 1-32 μ g/mL, de clavulanate (CLA) ou de NXL104 à 16-64 μ g/mL. Les contrôles sont les cultures en milieu Luria-Bertani (LB), 5×10^8 cellules sont prélevées pour l'extraction d'ARN et 2×10^{10} cellules pour le dosage de l'activité β -lactamase.

RT-PCR (PCR en temps réel)

L'ARN total est extrait en utilisant le kit Rneasy RNA protect (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Après traitement à la Dnase (Rnase-free Dnase Set, Qiagen) l'ARN est quantifié en utilisant le système Agilent (Figure 2).

Les oligonucléotides ont été choisis en utilisant le logiciel Primer Express (Table 1). Les réactions de PCR en temps réel sont effectuées avec l'ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), en utilisant le kit Quantitect Probe RT-PCR (Qiagen). Pour chaque gène (*ampC* et *rpsL*) les réactions sont faites en triple. L'étape de reverse transcription est effectuée à 50°C pendant 30 min ; les conditions de la réaction de PCR sont les suivantes : activation initiale de la DNA polymérase 15 min à 95°C, puis 40 cycles de PCR (15 secondes à 95°C, 60 secondes à 60°C). L'absence d'ADN contaminant est contrôlée pour chaque préparation d'ARN, par une réaction de RT-PCR réalisée sans reverse transcriptase. Les résultats sont analysés avec le logiciel Sequence Detection et la quantification relative est effectuée par la méthode dite $2^{-\Delta\Delta CT}$. Le gène *rpsL* (codant pour la protéine ribosomale 19) est le gène calibrateur pour *ampC*. Pour les inductions, les valeurs sont normalisées pour chaque souche par rapport à l'expression basale de *ampC* avant induction.

Dosage de l'activité β -lactamase

Les lysats bactériens bruts sont préparés en vortexant 2×10^{10} cellules bactériennes avec des billes de verre dans 200 μ L de tampon phosphate 100 mM. En utilisant une dilution adéquate pour le lysat bactérien (1/20 pour les inductions), et la nitrocéphaline à 100 μ M, la réaction d'hydrolyse est suivie pendant 15 min à 485 nm (Molecular Devices SpectraMaxPlus). Les résultats sont exprimés en vitesse de réaction (V_i , $\Delta A_{485nm}/min$) par mg de protéine.

Table 1 : Amorces pour la PCR en temps réel (transcripts *ampC* et *rpsL* d'*E. cloacae*)

Oligonucléotide	Séquence
<i>ampC</i> sens	5'-TGCGTATCGGGTCAATGT-3'
<i>ampC</i> sonde *	5'-TCAGGGTCTGGGGCTGGAGATGC-3'
<i>ampC</i> anti-sens	5'-CCTCCACGGGCCAGTTG-3'
<i>rpsL</i> sens	5'-CAGGTGACACCGTGAAGTG-3'
<i>rpsL</i> sonde *	5'-AAGTATGGTGTGGTGAAGTTCCAA-3'
<i>rpsL</i> anti-sens	5'-CGAATGCCTGACAGCGTTT-3'

*: modification 6-FAM (6-carboxy-fluoresceine) à l'extrémité 5' et TAMRA (6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine) à l'extrémité 3'

Table 2 : Valeurs des CMI des souches *E. cloacae* (μ g/mL)

Céfoxitine et ceftazidime (CAZ) sont de bons substrats pour les enzymes AmpC ; la céfoxitine est également un inducteur puissant d'AmpC, alors que le ceftazidime a un potentiel inducteur plus limité. La souche *E. cloacae* 293HT107 a été sélectionnée pour la suite de l'étude sur la base d'une résistance à la céfoxitine et une sensibilité à la ceftazidime.

Souches <i>E. cloacae</i>	FOX	CAZ	CAZ + CLA 4 μ g/mL	CAZ + NXL104 4 μ g/mL
P99	>128	>128	>128	1
293HT107	64	0.5	2	<0.125

REFERENCES

- Jones RN et al. Diagn Microbiol Infect Dis 1998, 31:461-466
- Lister PD et al. Antimicrob Agents Chemother 1999, 43:882-889
- Bonnefoy A et al. J Antimicrob Chemother 2004, 54:410-417
- Shackcloth J et al. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2005). Poster # 1348
- Levasseur P et al. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2005). Communication # F-1164

Financement : cette étude a été partiellement financée par OSEO ANVAR.

RESULTATS – MISE AU POINT DU DOSAGE D'ARNm AMPC

Figure 2 : Dosage de l'ARN total par la technique Agilent

La RT-PCR exige un dosage précis de l'ARN, qui est réalisé avec la technologie Agilent, ce qui permet également de vérifier la qualité de l'ARN extrait des différentes cultures bactériennes.

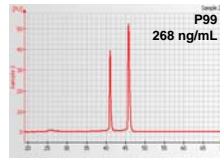


Figure 3 : Courbe d'amplification de *rpsL* et *ampC* (fluorescence en fonction du nombre de cycles)

La quantité de transcripts correspondant au gène calibrateur *rpsL* est comparable dans les différentes souches *E. cloacae* testées (7 souches testées au total ; résultats de 4 souches dans cette figure).

En revanche, la quantité de transcripts *ampC* est très variable selon les souches *E. cloacae* (voir Table 4 pour la quantification).

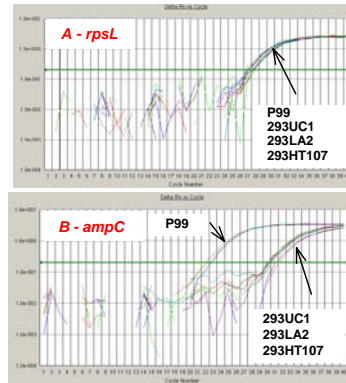


Table 3 : Courbe d'efficacité des amorces

L'efficacité d'amplification des amorces *ampC* et *rpsL* est mesurée en faisant varier la quantité d'ARN total (0,01-100 ng par réaction). On vérifie que l'on obtient une droite de pente similaire pour les 2 gènes. La valeur de cette pente est proche de la valeur théorique de -3,322, qui correspond à une efficacité d'amplification de 100%.

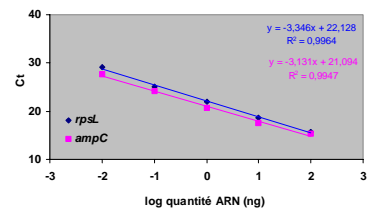


Table 4 : Expression basale d'AmpC dans 4 souches *E. cloacae*

Le niveau basal d'AmpC est évalué dans 3 souches résistantes à la céfoxitine mais sensibles à la ceftazidime. Il est comparé à celui de la souche P99 (mutant déréprimé stable d'AmpC) :

- niveau d'ARNm *ampC* : il est 150-300 fois plus élevé dans la souche P99
- activité β -lactamase : elle est 1000-1800 fois plus élevée dans la souche P99.

Souches <i>E. cloacae</i>	P99	293LA2	293HT107	293UC1
Expression normalisée des ARNm <i>ampC</i>	1.0000	0.0035	0.0040	0.0066
Activité contre la nitrocéphaline ($V_i/10^6$ cellules)	229	0.13	0.22	0.18

RESULTATS – INDUCTION D'AMP C DANS LA SOUCHE *E. CLOACAE* 293HT107

Figure 4 : Cinétique de l'expression d'AmpC dans la souche *E. cloacae* 293HT107 traitée par la céfoxitine (1 et 2 μ g/mL)

La quantité d'ARNm *ampC* est exprimée comme le ratio de la valeur au temps T0. L'augmentation des transcripts *ampC* est détectable rapidement après le début de l'incubation (10 min dans d'autres expériences ; résultats non montrés), et atteint un pic après 1-2 heures de culture.

L'augmentation de l'activité β -lactamase est décalée par rapport à celle des ARNm *ampC* ; cette augmentation est continue pendant les 4 heures d'incubation avec la céfoxitine.

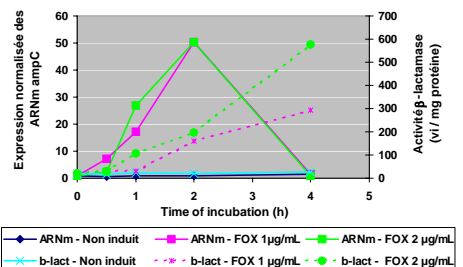
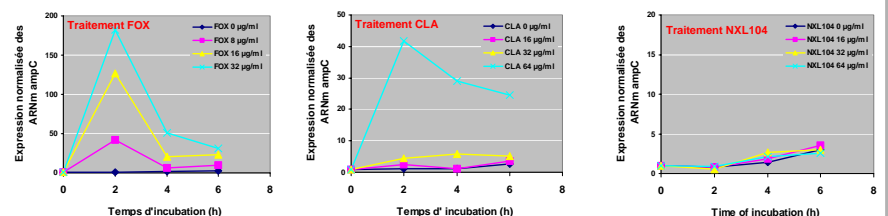


Figure 5 : Expression des ARNm *ampC* dans la souche *E. cloacae* 293HT107, après traitement par céfoxitine, clavulanate ou NXL104

La céfoxitine induit une augmentation importante des ARNm *ampC* dans les cellules 293HT107 : après 2h d'incubation, on mesure une augmentation d'un facteur x180 à la dose de 32 μ g/mL, x120 à 16 μ g/mL, et x40 à 8 μ g/mL.

Le clavulanate a également un effet significatif, avec une augmentation d'environ x40 des ARNm *ampC* à 64 μ g/mL. NXL104 n'a aucun effet sur la quantité des ARNm *ampC* dans les cellules 293HT107 durant les 6 heures de la culture.



CONCLUSIONS

1 – Comparée à la souche P99, la souche *E. cloacae* 293HT107 exprime un faible niveau basal d'AmpC, tant en terme d'ARNm, qu'en terme d'activité β -lactamase.

2 – A des concentrations sub-CMI, la céfoxitine et le clavulanate induisent la synthèse dose dépendante d'*ampC* dans la souche 293HT107 (augmentation des ARNm *ampC* de x50-180 pour la céfoxitine entre 8 et 32 μ g/mL ; augmentation de x40 pour le clavulanate à 64 μ g/mL). Le pic d'ARNm *ampC* est atteint après environ 2 heures d'incubation.

3 – Aux concentrations testées (16-64 μ g/mL), et durant les 6 heures de culture, NXL104 n'a aucun effet sur le niveau cellulaire d'ARNm *ampC* de la souche 293HT107.

NXL104 ne montre aucun potentiel pour l'induction d'AmpC dans la souche *E. cloacae* 293HT107, ce qui implique que ce composé ne risquerait pas de compromettre l'activité antibactérienne d'une β -lactamine à laquelle il serait associé.