

**AIX-MARSEILLE UNIVERSITE**  
Faculté de Médecine  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé – ED62

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**Diane Borselli**

En vue d'obtenir le grade de Docteur d'Aix-Marseille Université

**ADJUVANTS POUR LIMITER LA CONSOMMATION  
D'ANTIBIOTIQUES EN MEDECINE VETERINAIRE**

Soutenance le 2 mai 2017, devant le jury composé de :

Dr Jean-Yves Madec, <i>ANSES</i>	Rapporteur
Pr Françoise Van Bambeke, <i>Université catholique de Louvain</i>	Rapporteur
Dr Benjamin Ezrati, <i>CNRS</i>	Examineur
Dr Jean Michel Brunel, <i>CNRS</i>	Examineur
Dr Gérard-Marie Papierok, <i>Virbac</i>	Examineur
Dr Jean Michel Bolla, <i>INSERM</i>	Directeur de thèse



A ma grand-mère, un bel exemple de courage et d'amour.

*A me minà*, un beddu esempiu di forza è d'amori.

A mon oncle Elie.

*A me caru ziu*.





## Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations :</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre I. Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>I. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE</b> .....	<b>12</b>
1. Historique .....	12
2. Etat des lieux général.....	12
3. Causes de l'antibiorésistance et réponses des autorités .....	15
3.1 Médecine humaine.....	15
3.2 Médecine vétérinaire .....	16
4. La résistance chez les BGN.....	22
4.1 La résistance naturelle vs la résistance acquise .....	22
4.2 Les mécanismes de résistance des BGN.....	25
4.2.1 Mécanismes de résistance s'opposant à l'accumulation intracellulaire d'ATBs.....	25
4.2.1.1. Imperméabilité membranaire .....	26
a. Structure de la membrane des BGN : résistance intrinsèque.....	26
b. Imperméabilité liée à la modification /perte des porines.....	27
4.2.1.2. Pompes d'efflux .....	28
a. « Resistance Nodulation Division » (RND) .....	29
b. « Small Multidrug Resistance » (SMR).....	32
c. « Multidrug and Toxic Compound Extrusion » (MATE) .....	32
d. Superfamille « Major Facilitator » (MFS).....	33
e. Superfamille des ABC transporteurs (ABC) .....	33
4.2.2 Inactivation enzymatique .....	34
4.2.3 Altération / protection de la cible.....	35
<b>II. ANTIBIOTIQUES ET MEDECINE VETERINAIRE D'ELEVAGE</b> .....	<b>37</b>
1. Utilisation des ATBs en médecine vétérinaire .....	37
1.1 Antibiothérapie .....	37
1.2 Métaphylaxie .....	38
1.3 Antibioprophylaxie.....	39
1.4 Facteurs de croissance .....	39

2. Bactéries responsables d'infection respiratoires chez le porc.....	40
2.2 <i>Pasteurella multocida</i> .....	45
2.3 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	48
3. Résistance aux ATB utilisés en médecine vétérinaire .....	51
3.1 Résistance aux tétracyclines .....	51
3.2 Résistances aux macrolides, lincosamide et streptogramines (MLS) ...	52
3.3 Résistances aux $\beta$ -lactames.....	53
3.4 Résistance aux sulfamides et triméthoprim.....	54
3.5 Résistance aux fluoroquinolones .....	56
3.6 Résistance aux aminosides .....	56
3.7 Résistance au chloramphénicol et au florfénicol .....	57
<b>III. SOLUTIONS POUR LUTTER CONTRE L'ANTIBIORESISTANCE.....</b>	<b>61</b>
1. Découverte de nouveaux médicaments .....	61
1.1 Nouvelles molécules.....	61
1.2 Peptides antimicrobiens .....	62
2. Thérapie phagique .....	63
3. Utilisation de probiotiques .....	64
4. Combiner les molécules entre elles .....	65
4.1 Combinaison ATB-ATB.....	65
4.2 Combinaison ATB-Adjuvant.....	66
4.2.1 Adjuvants anti-virulence .....	67
4.2.1.1 Les inhibiteurs du Quorum Sensing.....	67
4.2.1.2 Les inhibiteurs du système de sécrétion de type III (SST3) .....	67
4.2.1.3 Les inhibiteurs de la mobilité bactérienne .....	68
4.2.2 Adjuvants anti-résistance .....	70
4.2.2.1 Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases .....	70
4.2.2.2 Les inhibiteurs d'efflux .....	70
4.2.2.3 Perméabilisants de la membrane externe .....	75
5. Diminuer l'usage et la consommation des ATB en médecine humaine et vétérinaire .....	77
<b>IV. LES POLYAMINES .....</b>	<b>79</b>
1. Origine et synthèse des polyamines.....	79
2. Les polyamines : rôle et potentiel thérapeutique .....	80

<b>Objectifs et présentation des travaux de thèse .....</b>	<b>84</b>
<b>Chapitre II. Résultats.....</b>	<b>88</b>
<b>New Ianthelliformisamine derivatives as antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria .....</b>	<b>90</b>
<b>Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of P. aeruginosa to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro .....</b>	<b>104</b>
<b>Motuporamine derivatives as antimicrobial agents and antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria.....</b>	<b>125</b>
<b>Polyamines derivatives as florfenicol’s adjuvants and motility inhibitors to treat infections involving a porcine pulmonary pathogen: Bordetella bronchiseptica. ....</b>	<b>137</b>
<b>Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria? .....</b>	<b>182</b>
<b>Chapitre III. Discussion Générale et perspectives .....</b>	<b>194</b>
<b>Chapitre IV. Conclusion .....</b>	<b>202</b>
<b>Chapitre V. Références bibliographiques.....</b>	<b>204</b>



## Remerciements

Ce travail de thèse s'est trouvé au cœur d'une collaboration entre l'UMR-MD1 Transporteurs Membranaires, Chimiorésistance et Drug Design (Université Aix-Marseille / IRBA) et l'industriel pharmaceutique vétérinaire Virbac, sous la direction du Dr. Jean-Michel Bolla et du Dr. Gérard-Marie Papierok.

A ce titre je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Jean-Marie Pagès, directeur de l'unité UMR-MD1. « Chef » merci pour votre accueil et votre sympathie à mon égard, pour vos conseils scientifiques mais également de m'avoir fait partager vos petits filons de randonnée et l'adresse de cette fameuse boulangerie d'où vous nous ramenez les meilleures pompes à huile !

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Jean-Michel Bolla pour avoir encadré ce travail de thèse. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir prise sous votre aile lorsque, de l'université de Corse, je vous ai adressé ma demande de stage de fin de licence. Quel chemin parcouru depuis ! Je vous remercie pour votre confiance, pour toutes nos discussions, les scientifiques bien sûr, et celles qui l'étaient un peu moins... Je vous remercie également pour la liberté que vous m'avez laissée dans la conduite de certaines expériences, même lorsque nos opinions divergeaient et que vous saviez que cela n'aboutirait pas toujours, vous me laissiez faire, n'est-ce pas cela être chercheur ? « *Per tuttu, vi rigraziu* ».

Je remercie également le Dr Gérard-Marie Papierok qui fut mon responsable scientifique au sein de la société Virbac pour sa confiance durant la conduite de ce projet et sa disponibilité lors de nos échanges qui nous ont permis d'avancer.

J'adresse également mes sincères remerciements au Dr. Jean Michel Brunel pour avoir assuré toute la partie de synthèse chimique de ce travail. Merci pour ta confiance et ton implication pendant ces trois années. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec

toi, merci pour ta réactivité lorsque les tubes étaient vides et pour toutes nos discussions fructueuses ! Enfin, merci pour ton soutien.

Je tiens également à remercier le Dr. Vincent Méjean pour avoir accepté d'être mon parrain de thèse. Merci pour ton écoute, ta disponibilité et ton soutien. Je te propose une plongée sous-marine lors de ta prochaine venue en Corse !

Je remercie également tous les membres de l'UMR-MD1 pour avoir fait de ce lieu de travail un endroit accueillant grâce à votre bonne humeur, les conditions de travail y étaient plus qu'agréables. Je crois que je n'ai jamais mangé autant de gâteaux d'ailleurs ! (Oui je sais que j'en dois encore un...). Un grand merci particulièrement à Jessica, sans toi cette thèse n'aurait pas eu le même goût, merci pour ton soutien ces trois ans ont été riches en émotions n'est-ce pas ? Merci à Christelle, ma partenaire inconditionnelle de course à pied, instigatrice de nos défis sportifs ! Merci également à Fatiha et Elizabeth pour toutes ces pauses méridiennes (mais pas que d'ailleurs) rendues bien agréables par votre présence.

Finalement, j'adresse mes profonds remerciements et toute ma reconnaissance à ma famille. Papa, Maman, Charles merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre soutien, sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui. Thierry, merci pour tes encouragements et ton amour qui m'ont porté pendant ces années. Je ne te remercierai jamais assez pour toute la patience dont tu as fait preuve.  
Je vous aime.

Un merci également à Elise et André, « ma tata et mon tonton » d'adoption pour avoir été mes repères loin de ma famille et pour tous ces dimanches passés avec vous.

Merci à mes ami(e)s et particulièrement à mes « marions » qui donnent tort à l'adage « *loin des yeux, loin du cœur* », merci aussi à mes acolytes de caserne ils et elles se reconnaîtront, je crois que j'ai eu des nuits aussi intenses que mes journées ! Enfin merci à toutes les personnes qui m'ont soutenue et accompagnée de près comme de loin durant ces trois ans.

## **Avant-propos**

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche – CIFRE. Ce dispositif subventionne une entreprise (de droit français), afin d'embaucher un doctorant qui sera placé au cœur d'une collaboration entre l'entreprise et un laboratoire compétent pour répondre à la problématique posée par cette dernière. Les CIFREs sont financées en partie par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche qui a confié leur mise en œuvre à l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie – l'ANRT. L'entreprise emploie directement l'étudiant, dans mon cas, l'industriel pharmaceutique vétérinaire Virbac m'a confié une mission de recherche que j'ai effectuée au sein de l'UMR-MD1. De plus, ce dispositif assure le financement des recherches durant toute la durée de la thèse dans le cadre d'un contrat de collaboration entre l'unité de recherche et l'entreprise. Le laboratoire assure l'encadrement de la thèse sur le plan académique et accueille l'étudiant environ 80% du temps. Le constat alarmant du phénomène d'antibiorésistance croissant a conduit les autorités à établir des recommandations de bon usage des ATBs à la fois en médecine humaine mais également en médecine vétérinaire et donc à limiter les quantités d'ATBs utilisées. Dans ce contexte, l'objet de ma thèse CIFRE était de répondre à la problématique posée par la société Virbac afin qu'il puisse disposer d'un arsenal thérapeutique plus efficace tout en diminuant les doses d'ATBs actuellement nécessaires. Par le passé l'industriel pharmaceutique Virbac et l'UMR-MD1 ont travaillé en collaboration dans le but d'apporter une solution à la (sur)consommation d'antibiotiques et particulièrement de la doxycycline dans le traitement des colibacilloses aviaires dans les élevages de volailles. Le laboratoire s'étant montré compétent et ayant ouvert des pistes de thérapies combinatoires permettant de diminuer les doses utilisées, la société Virbac a ensuite souhaité adresser la même problématique dans les élevages de porcs. En effet, ces derniers sont sévèrement touchés par des infections pulmonaires mettant en cause divers agents pathogènes bactériens ce qui impacte fortement la production. Le traitement de ces infections bactériennes requière donc des traitements ATBs qui sont distribués dans l'eau de boisson ou sous forme de solutions injectables, ce qui implique une utilisation plus ou moins importante de ces molécules. Le dispositif CIFRE m'a ainsi permis d'effectuer ce travail de recherche tout en tenant compte des contraintes de l'entreprise.





## **Abréviations :**

**AESA** : Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire

**Afssaps** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

**AMM** : Autorisation de mise sur le Marché

**ANMV** : Agence Nationale du Médicament Vétérinaire

**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement  
et du travail

**ARNr** : ARN ribosomal

**BGN** : Bactéries à Gram Négatif

**BGP** : Bactéries à Gram Positif

**BLSE** :  $\beta$ -Lactamases à Spectre Etendu

**CDC** : Centres de Contrôle et de Prévention des Maladies (*Centers for Diseases Control  
and Prevention*)

**ECDC** : Centre Européen de Contrôle et de Prévention des Maladies (*European Center  
for disease Prevention and Control*)

**EMA** : Agence Européenne du Médicament (*European Medicines Agency*)

**FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (*Food and  
Agriculture Organization of the united nations*)

**FDA** : Administration Américaine des Denrées Alimentaires et des Médicaments (*Food  
and Drug Administration*)

**FNPEIS** : Fond National de Prévention, d'Education et d'Information pour la Santé

**HMA** : Réseaux des Chefs d'Agence Médicales (*Heads of Medicines Agencies*)

**MDR** : Multirésistance aux antibiotiques (*Multi Drug Resistance*)

**MLS** : Macrolide, Lincosamides, Streptogramines

**PDF** : Peptide Déformylase

**PG** : Peptidoglycane

**PLP** : Protéines Liant la Pénicilline

**PME** : Protéine de la Membrane Externe

**PMF** : Force Proton Motrice

**PMBN** : Polymyxine-B-Nonapeptide

**OIE** : Organisation Mondiale de la Santé Animale

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé

**UE** : Union Européenne

**SIMV** : Syndicat de l'Industrie du Médicament Vétérinaire et réactif

**STM** : Segments Trans-Membranaires

**1,2 DNA** : 1,2'-dinaphthylamine

# Chapitre I. Introduction

# I. ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIORESISTANCE

## 1. Historique

L'histoire, depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, n'aura cessé de démontrer le rôle prépondérant que jouent les antibiotiques (ATBs) dans notre quotidien. En effet, depuis leur découverte en 1928 par Alexander Fleming, les ATBs sont devenus indispensables à la médecine humaine comme vétérinaire. Néanmoins, leur utilisation massive et/ou inappropriée durant le siècle dernier a conduit à l'émergence d'un phénomène naturel et inéluctable, *l'antibiorésistance*, évènement d'ailleurs prédit par A. Fleming lui-même. Une corrélation a d'ailleurs pu être établie entre la consommation d'ATBs et les résistances (1). De fait, l'utilisation des ATBs n'est pas réservée exclusivement aux individus (humains ou animaux) malades, puisqu'ils sont également utilisés en prophylaxie pour prévenir des infections avant une intervention chirurgicale par exemple, ou, dans un élevage exposé à un risque infectieux. D'autre part, les ATBs ont longtemps été utilisés comme facteurs de croissance dans les élevages, ce qui a conduit à la sélection de bactéries résistantes dont le génome a été modifié soit par mutation et /ou par acquisition de matériel génétique, favorisant leur développement aux dépens des bactéries sensibles. Ce phénomène d'antibiorésistance en constante expansion compromet l'arsenal thérapeutique existant ce qui conduit de plus en plus les cliniciens vers des impasses thérapeutiques.

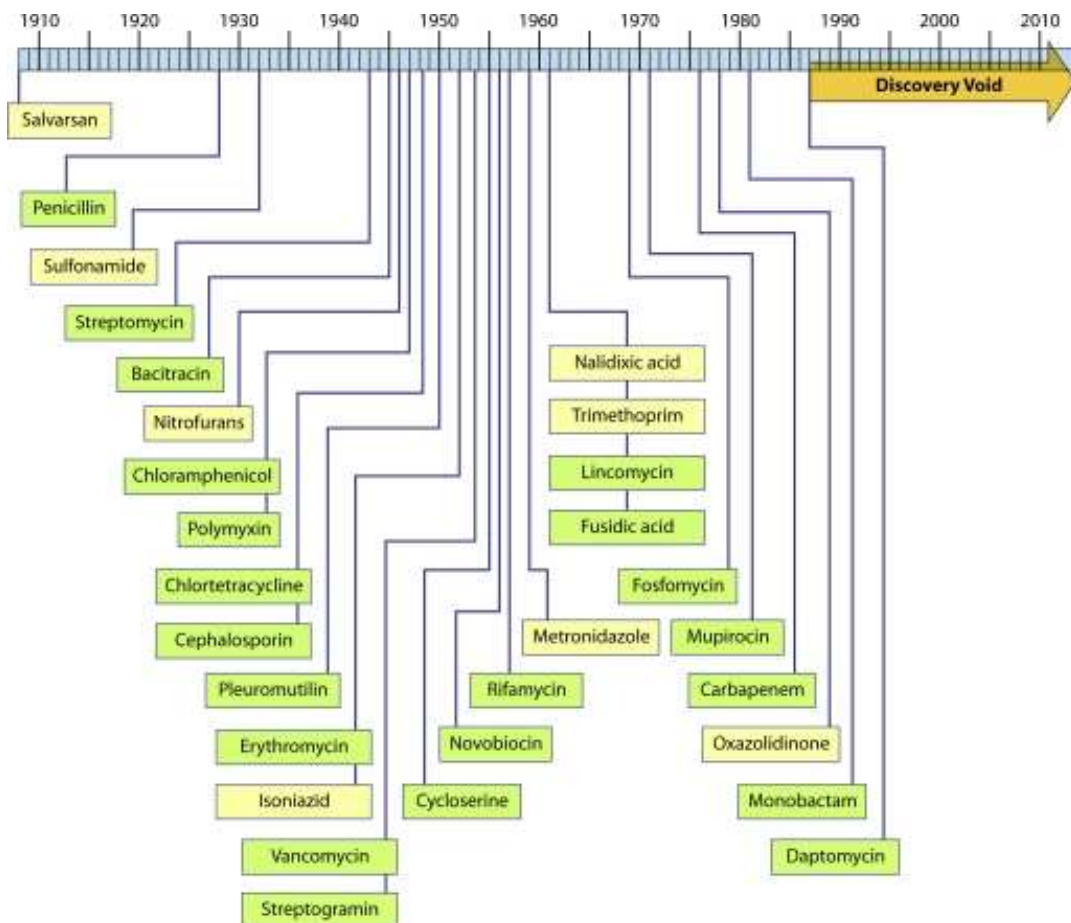
## 2. Etat des lieux général

Ce phénomène d'antibiorésistance est devenu un problème de santé publique majeur à l'échelle internationale. Plusieurs études ont cherché à estimer le poids des infections causées par des bactéries multirésistantes tant sur le plan de la mortalité que sur le plan économique. Selon un rapport du centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) de 2009 (2), le nombre de décès annuels liés aux infections multirésistantes est estimé à 25 000 en Europe. En plus de ces décès, les coûts des soins de santé et les pertes de productivité associées ont été estimées à au moins 1,5 milliard d'euros en Europe et à plus de 55 milliards de dollars aux Etats-Unis selon un rapport de 2013 du centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC). De plus, les infections dues aux bactéries multirésistantes représentent un surcoût difficilement

estimable mais non négligeable pour les organismes de santé comme l'assurance maladie en France.

Le phénomène d'antibiorésistance ne se limite pas seulement à la santé humaine en termes de conséquences mais aussi en termes de responsabilités. En effet, ce phénomène résulte de l'utilisation des ATBs par les différents acteurs de la santé humaine et animale ainsi que par des industries agroalimentaires à travers le monde. Ces influences multiples concourent grandement à l'expansion du phénomène d'antibiorésistance. Prenons l'exemple de la France, où en 2015, il a été vendu 786 tonnes d'ATBs destinés à la santé humaine et 514 tonnes à la santé animale. Notons cependant que cette tendance est très variable en Europe selon le pays considéré mais que la France se place parmi les pays les plus consommateurs avec la Grèce et la Roumanie (3). En santé animale, 96% des ATBs sont consommés par les animaux destinés à la consommation humaine et 4% seulement aux animaux domestiques (3), (4). Ces chiffres illustrent bien que la consommation d'ATBs en santé animale et particulièrement dans les élevages joue un rôle majeur dans le phénomène d'antibiorésistance. Il est donc impératif de limiter la consommation d'ATBs à la fois en médecine humaine mais également en médecine vétérinaire.

D'autre part, depuis l'introduction du linezolide (oxazolidinones) au début des années 2000 utilisé pour traiter des infections impliquant des bactéries à Gram positif (BGP) peu de nouvelles molécules ont été mises sur le marché depuis 1987 (Cf. Figure 1) malgré les efforts menés dans la recherche et le développement d'antimicrobiens (5). En effet, depuis l'on constate un véritable vide dans les découvertes que les anglo-saxons appellent « the drug discovery void ». Ce manque de nouvelles molécules est d'autant plus problématique chez les bactéries à Gram négatif (BGN). En effet, les cibles sont souvent communes aux BGP et BGN mais les antimicrobiens qui fonctionnent *in vitro* sur la cible purifiée ne passent pas la membrane externe des BGN ce qui restreint l'arsenal thérapeutique. De plus, parmi les pathogènes les plus retrouvés et problématiques en médecine humaine, les pathogènes dits ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et les espèces d'Entérobactéries, on dénombre cinq espèces à Gram négatif.



**Figure 1** : Illustration de la « drug discovery void » (6). Les dates indiquées correspondent à la date de découverte de la molécule ou du dépôt de brevet.

Le « Drug discovery void » résulte notamment du désintérêt des industries pharmaceutiques qui s'explique en partie par la faible rentabilité du marché ATB car la durée d'un traitement est relativement courte (75% des traitements ATB n'excèdent pas 10 jours), par la mise en concurrence du marché générique mais également par la limitation des prescriptions des nouvelles molécules afin de retarder l'apparition de résistance. Il est effectivement essentiel de préserver l'arsenal thérapeutique existant en attendant que de nouvelles cibles soient identifiées, et que de nouvelles molécules soient développées.

### 3. Causes de l'antibiorésistance et réponses des autorités

#### 3.1 Médecine humaine

En médecine humaine, la principale cause de l'antibiorésistance est due aux prescriptions inadaptées des ATBs par les professionnels de santé. Les raisons de ces prescriptions abusives sont multiples : difficultés d'établir un diagnostic, prise en compte des complications pouvant être causées par des infections bactériennes, augmentation des populations à risques telles que les personnes âgées et immunodéprimées ou encore par une sollicitation venant directement des patients. Au début des années 2000, la France était le pays d'Europe qui consommait le plus d'ATBs, l'on y dénombrait alors 100 millions de prescriptions par an. Trente millions de ces prescriptions auraient concerné des infections d'origine virale selon le ministre de la Santé de l'époque, Bernard Kouchner.

Un comité d'experts réunis autour de ce dernier et du directeur de l'institut de Veille sanitaire, Jacques Drucker, a alors mis en place le premier plan national pour préserver l'efficacité des ATBs. Ce plan se décline en un programme d'actions pluriannuel qui a permis la sensibilisation des prescripteurs mais également du public, notamment grâce à la diffusion de la fameuse campagne « *les ATBs, c'est pas automatique* » financée par le fond national de prévention, d'éducation et d'information pour la santé (FNPEIS). Des mesures ont également été engagées auprès des prescripteurs instaurant ainsi des outils d'aide au diagnostic rapide des angines bactériennes par exemple. Ce plan d'action a également généralisé les comités de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) qui œuvrent pour le bon usage des ATBs dans le milieu hospitalier. Cette démarche a obtenu le soutien du ministère de l'agriculture qui est une composante centrale dans la lutte contre l'antibiorésistance.

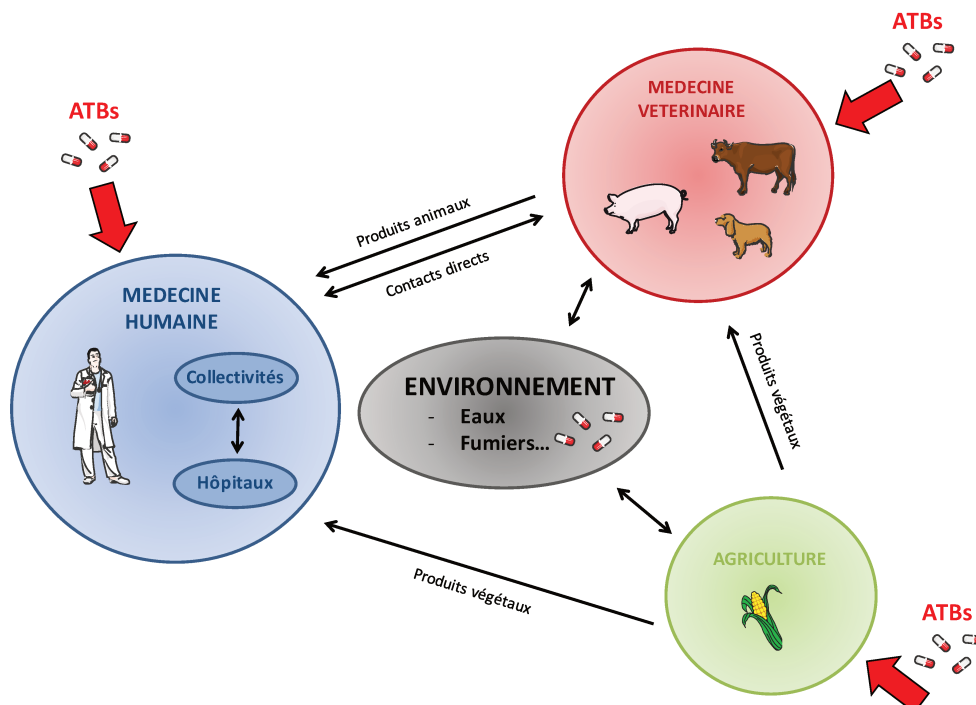
Ainsi sur le plan national, la consommation d'ATBs en médecine humaine a diminué de 16% entre 1999 et 2009 d'après un rapport de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps, actuellement ANSM) publié en 2011 et intitulé « Dix ans d'évolution des consommations d'ATBs en France ». Cependant selon un rapport de 2016 de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (3), la consommation d'ATBs en ville s'inscrit à la hausse en 2015 par rapport à 2005 et passe de 28,9 à 29,9 doses pour 1000 habitants et par jour, mais reste néanmoins inférieure à la consommation observée au début des années 2000. Par ailleurs les établissements de santé montrent une consommation

d'ATBs stable depuis les dix dernières années avec environ 2,2 doses pour 1000 habitants et par jour sur l'ensemble des établissements publics et privés.

Sur le plan international, des actions concertées se sont également mises en place au travers des instances européennes telles que l'Agence Européenne du médicament (EMA), le Centre Européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC), le réseau des chefs d'agence médicales (HMA) et l'autorité européenne de Sécurité Alimentaire (AESA). Les mesures engagées comprennent notamment des recommandations sur un usage prudent des ATBs. La lutte contre l'antibiorésistance fait également l'objet d'une concertation outre-Atlantique qui a permis la création d'une alliance en 2009 entre les Etats-Unis et l'Europe, la « *Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance* » (TATFAR).

### 3.2 Médecine vétérinaire

L'apparition d'échecs thérapeutiques en médecine humaine dus au phénomène d'antibiorésistance constitue un enjeu sanitaire majeur pour les filières d'élevage. En effet l'homme et l'animal partagent le même environnement.



**Figure 2 : Illustration de l'écosystème de l'antibiorésistance.** Adapté de *Toutain 2007 (7)*. NB. L'utilisation des ATBs dans les cultures est interdite dans l'Union Européenne (UE).



Le cycle de vie des molécules pharmaceutiques comme les ATBs (Cf. Figure 2) est complexe puisqu'il ne limite pas seulement à l'ingestion par l'individu (homme ou animal). En effet ils sont ensuite excrétés en quantité variable en fonction du mode d'administration et de l'espèce concernée, et, le taux d'excrétion peut varier de 10% à 90%. Par exemple, pour les ATBs les plus consommés comme les  $\beta$ -lactames, les tétracyclines, les (fluoro)quinolones, les phénicolés et le triméthoprime le taux d'excrétion est généralement de 50%. Les caractéristiques pharmacocinétiques des ATB sont également un paramètre important. En effet, la doxycycline est rapidement absorbée et largement distribuée dans l'organisme mais n'est pas métabolisée de manière significative et est excrétée principalement dans les fèces (8). A l'inverse le florfénicol est excrétée rapidement essentiellement par voie urinaire et est intensivement métabolisé (9). Ces quantités rejetées contribuent à la sélection de bactéries résistantes aux ATBs dans l'environnement, ce qui constitue un véritable réservoir de gènes conférant des résistances et pouvant être transmis aux pathogènes animaux et/ou humains. Par ailleurs, la transmission des résistances bactériennes de l'animal à l'homme demeure un phénomène rare mais qui existe (10). Le mode de transmission le plus fréquent se fait *via* les aliments qu'ils soient d'origine animale ou végétale et est souvent à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIAC). En effet, des aliments (d'origine animale ou végétale) bruts ou mal cuits peuvent contenir des bactéries telles que *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter* ou *Salmonella* qui une fois ingérées peuvent transmettre leurs résistances aux bactéries commensales *via* un échange de plasmide par exemple (10). Un exemple récent illustre parfaitement ce phénomène de contamination, l'épisode de la contamination humaine par la souche O104 :H4 d'*E. coli* qui est un isolat enterohémorragique responsable du syndrome hémolytique et urémique et dont la transmission avait mis en cause la consommation de concombres provenant d'Espagne en 2011. Un autre exemple de transmission de résistance entre animal et homme est la contamination par contact direct (Cf. Figure 2) comme ce fut le cas pour des éleveurs de porcs aux Pays-Bas contaminés en 2006 par un staphylocoque doré résistant à la méticilline (SARM) initialement présent dans la flore commensale des porcs sains.

Les autorités ont ainsi pris conscience que tous les réservoirs, humain, animal et environnemental sont en interactions perpétuelles et constituent ainsi l'écosystème de

l'antibiorésistance (Cf. Figure 2). Aussi, il est important d'agir sur chacun d'eux pour limiter la pression causée par la consommation d'ATBs.

Depuis les années 1990, de nombreuses initiatives ont vu le jour tout d'abord sur le plan international autour de la problématique de la consommation et de la surveillance de l'antibiorésistance en médecine vétérinaire. Un groupe d'experts réunis en 2003, sous l'égide de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommandait l'établissement d'un programme de surveillance pour obtenir des informations sur les quantités d'ATBs utilisées chez les animaux producteurs de denrées afin d'amorcer un usage raisonné des ATBs en médecine vétérinaire. Dans un deuxième temps le but était d'établir un lien entre l'usage d'ATBs en médecine humaine et le profil de résistance de souches bactériennes récoltées à partir d'animaux producteurs de denrées, de produits alimentaires d'origine animale ainsi que des exploitations environnantes. Cela a permis d'accélérer l'évaluation des risques menée par la FDA sur l'identification d'ATBs utilisés en médecine vétérinaire qui pourraient être critiques pour l'homme. Ainsi, depuis 2007 l'OIE a développé une liste d'antimicrobiens d'importance primordiale en médecine vétérinaire qui est mise à jour tous les ans. Cette liste comporte des recommandations sur l'utilisation de certains ATBs qui sont d'une importance cruciale à la fois pour la médecine humaine et vétérinaire. Dans cette liste on retrouve notamment les fluoroquinolones et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération. En France il faudra attendre 2013 pour observer une diminution de l'usage des céphalosporines de près de 10% par rapport à 2012 tandis que la consommation de fluoroquinolones semble rester stable. Par ailleurs depuis 2009, la législation européenne à travers le règlement (CE) n° 470/2009 du Parlement européen a établi des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale. En effet, pour chaque ATB utilisé dans les élevages le règlement impose de déterminer le *niveau maximal de résidus (MRL)* qui est le niveau maximum de résidus d'ATBs acceptable dans les carcasses à l'abattoir sans aucun effet néfaste sur la santé publique. Le calcul de ce MRL est basé un paramètre toxicologique qui est le *niveau d'effet non-observé (NOEL)*, niveau au-dessous duquel les effets indésirables ne se produisent pas (11).

Toutes ces démarches internationales ont permis d'initier des actions à l'échelle nationale, notamment pour surveiller l'évolution du phénomène d'antibiorésistance par la mise en place de réseaux de surveillance et d'enquêtes, coordonnés par le ministère chargé de l'agriculture et par l'ANSES. Cela a permis d'encourager le bon usage des ATBs à la fois auprès des filières d'élevage, des vétérinaires mais également des industries pharmaceutiques. C'est ainsi qu'un suivi des ventes des médicaments vétérinaires contenant des ATBs a été mis en place depuis 1999 par l'ANSES et l'agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) en se basant sur une des lignes directrices de l'OIE relative à la surveillance des quantités d'ATBs utilisées en élevage. Ce suivi est réalisé en collaboration avec le Syndicat de l'Industrie du Médicament Vétérinaire et réactif (SIMV) et est basé sur la déclaration annuelle des ventes d'ATBs par les laboratoires, qui fournissent également une estimation de la répartition des ventes par espèce. En 2013, le tonnage de principes actifs vendus a été le plus faible enregistré et s'élève à 699 tonnes, depuis la mise en place du suivi, il correspond à une diminution de 34% sur les cinq années précédentes. Une augmentation de 11,8% a été constatée en 2014 mais le suivi de cette année serait biaisé dû à la parution de la loi 2014-1170, dite « d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt » qui a instauré la fin des rabais sur les ATBs à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2015 et aurait ainsi conduit les acteurs de la distribution et les prescripteurs à constituer des stocks de médicaments contenant des ATBs. Cette hypothèse est confortée par une baisse de 40% des ventes d'ATBs observée durant le 1<sup>er</sup> semestre 2015. Afin d'apporter une évaluation plus précise des quantités d'ATBs absorbées par les animaux il a été mis en place un indicateur appelé l'**ALEA** (*Animal Level of Exposure to Antimicrobials*), qui est corrélé au pourcentage d'animaux traités par rapport à la population animale totale et qui constitue *l'indicateur le plus fiable*. Si cet indicateur a mis en évidence une augmentation du niveau d'exposition global des animaux aux ATBs de 29,7% entre 1999 et 2007, il montre également une diminution de ce niveau entre 2007 et 2011 de 12,2%. Cependant, il faut considérer ces chiffres avec précaution car les nouvelles générations d'ATBs requièrent des quantités plus faibles de molécules ce qui revoit à la baisse les quantités nécessaires, sans pour autant diminuer la consommation proprement dite. Néanmoins, ces données reflètent la tendance à la baisse du niveau d'exposition des animaux aux ATBs et traduit la volonté des acteurs professionnels à maîtriser leur consommation. Dans la continuité de cette dynamique, le Ministère de l'agriculture a mis en œuvre en 2009, un plan

national de réduction des risques de résistance aux ATBs en médecine vétérinaire, appelé : **plan ECOANTIBIO**. Ce plan quinquennal répond à un double objectif :

- « Diminuer la contribution des ATBs utilisés en médecine vétérinaire à la résistance bactérienne, et à ses conséquences sur la santé des animaux et la santé publique »
- « Préserver de manière durable l'arsenal thérapeutique, et ce, d'autant plus que la perspective de développement de nouveaux ATBs, en médecine vétérinaire est réduite »

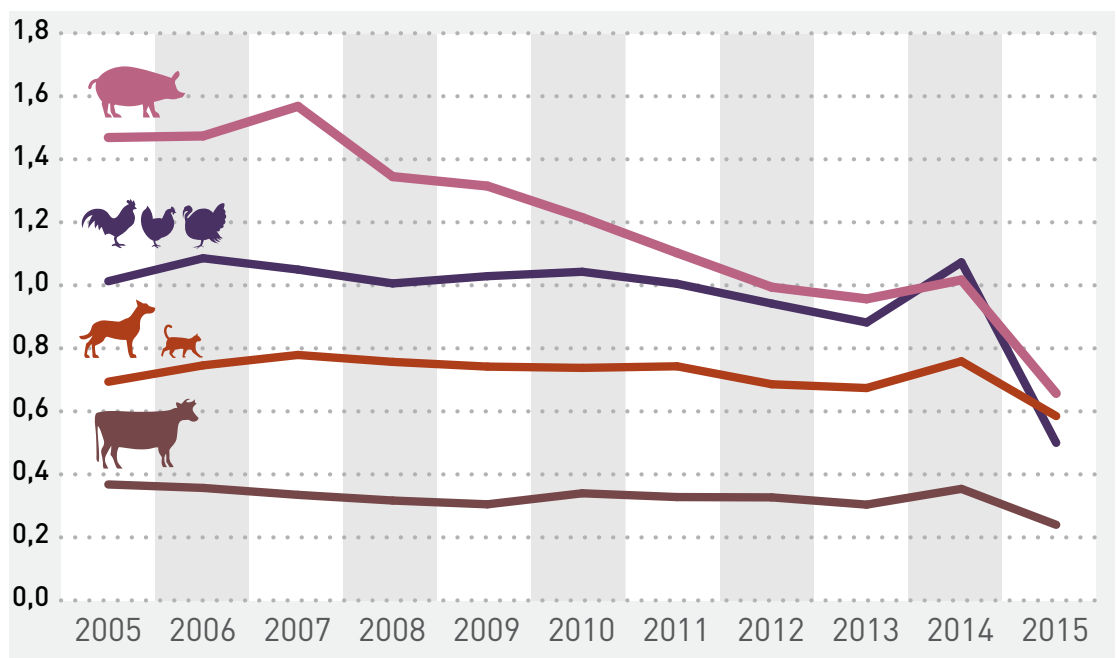
Il s'articule autour de 5 axes :

- **Axe 1** : Promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs aux risques liés à l'antibiorésistance et à la nécessité de préserver l'efficacité des ATBs,
- **Axe 2** : Développer des alternatives permettant d'éviter les recours aux ATBs
- **Axe 3** : Renforcer l'encadrement et réduire les pratiques à risque,
- **Axe 4** : Conforter le dispositif de suivi de la consommation des ATBs et de l'antibiorésistance,
- **Axe 5** : Promouvoir les approches européennes et les initiatives internationales.



Chaque axe comporte un certain nombre de mesures qui ont toutes pour but de donner des lignes directives afin de réaliser l'objectif présenté. Parmi celles-ci, certaines prévoient de développer une offre de formation continue et adaptée en matière de sécurité et de bonne utilisation des ATBs, notamment auprès des éleveurs et des techniciens intervenant en élevage afin de faire changer les comportements vis-à-vis de l'usage des ATBs. Il est également envisagé, de dégager des consensus sur le traitement de certaines pathologies avec une catégorisation des ATBs à utilisation restreinte et sous conditions, des ATBs déconseillés et ceux à ne jamais utiliser. Cela permettra de fournir des indications thérapeutiques en accord avec les lignes guides nationales et internationales (12). Par ailleurs cette politique de sensibilisation prévoit également d'améliorer la communication scientifique auprès des professionnels prescripteurs et dispensateurs et de transmettre des informations relatives à la résistance aux ATBs. Cela se fait *via* les réseaux d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales (RESAPATH) mis en place par l'ANSES dans le but d'inciter les vétérinaires à recourir davantage aux antibiogrammes ce qui facilitera le diagnostic et favorisera ainsi l'utilisation raisonnée des ATBs en privilégiant le recours aux ATBs à

spectre étroit (12). Aussi, depuis plusieurs années l'on observe une diminution notable du nombre de traitements par animal et par an (Cf. Figure 3). Cette diminution est d'autant plus marquée depuis 2010, grâce aux mesures du plan EcoAntibio. Dans ce contexte, la France se place en 2013, au 10<sup>ème</sup> rang des pays les plus consommateurs sur les 26 pays européens participant au suivi des ventes d'ATBs en santé animale (3). Notons également que parmi les animaux d'élevage, l'ALEA le plus important en 2015 est retrouvé pour les espèces porcines et les volailles avec respectivement un ALEA de 0,66 et 0,50 (Cf. Figure 3).



**Figure 3 : Estimation du nombre de traitements par animal (ALEA) sur la période 2005 – 2015.**  
(3)

Par ailleurs, c'est au travers de l'axe 2 que ce plan soutient la recherche de nouvelles molécules ATBs qui seraient réservées à la médecine vétérinaire et non critiques pour l'homme, ou promeut le maintien des autorisations de mise sur le marché (AMM) des molécules ATBs anciennes non critiques. De plus, une des mesures phares de cet axe concerne le domaine de la recherche pour limiter la consommation des ATBs en élevage, ainsi que l'étude des mécanismes de résistance et leurs mécanismes d'induction s'il y en a, particulièrement pour les bactéries responsables de zoonoses. Un deuxième plan ECOANTIBIO est déjà programmé pour 2017 afin d'assurer la continuité des mesures engagées. Il doit répondre à un double objectif, un objectif quantitatif devant permettre

une réduction de 25% de l'usage des ATBs dans les 5 prochaines années et, dans le même temps, un objectif qualitatif avec l'accent mis sur les ATBs considérés comme critiques pour l'homme.

Les ATBs sont un bien commun qu'il importe de préserver car ils sont indispensables à la médecine humaine et vétérinaire. La lutte contre l'antibiorésistance nécessite une action coordonnée des pouvoirs publics et privés du secteur humain et animal. L'objectif de mon travail de thèse était de trouver une solution pour diminuer la consommation d'ATBs en médecine vétérinaire et s'inscrit totalement dans les mesures du plan ECOANTIBIO.

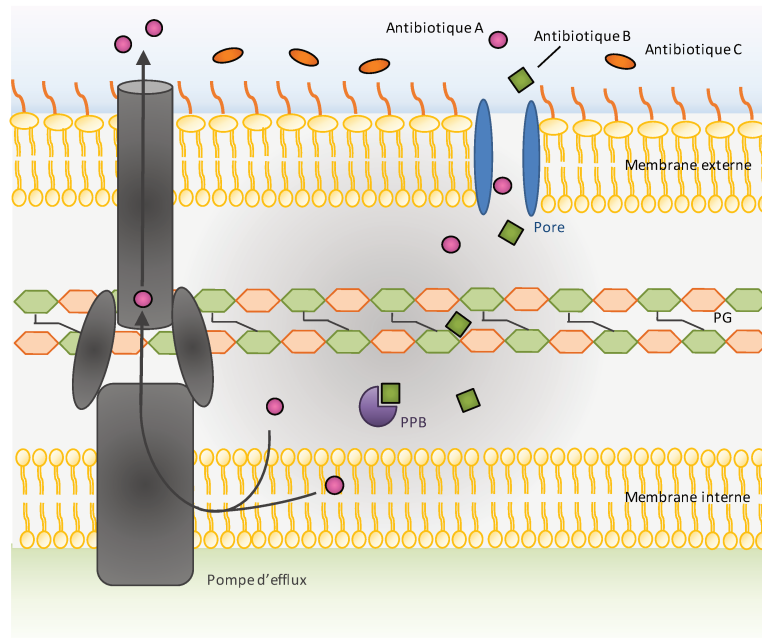
#### **4. La résistance chez les BGN**

Les bactéries sont la forme de vie la plus étendue sur terre car elles sont capables de s'adapter à tous les environnements même les plus extrêmes en terme de température, de pH, de salinité ou encore de pression (13). Elles sont également capables de se protéger contre une agression toxique comme les ATBs. Pour cela, elles possèdent une *résistance* dite *naturelle*, c'est-à-dire indépendante de toute pression de sélection par les ATBs, mais leur plasticité génomique et leur capacité d'échanger des informations génétiques leur permet *également d'acquérir des résistances* (14). Par ailleurs, elles sont également capables de moduler l'expression de leurs déterminants de résistance par une fine régulation génétique.

##### **4.1 La résistance naturelle vs la résistance acquise**

La résistance bactérienne est souvent considérée comme un caractère acquis par des bactéries sensibles et attribuée à l'*acquisition* dite *horizontale de gènes* de résistance aux ATBs, notamment par transfert de plasmides (15) ou alors, à l'apparition spontanée de mutations dans leur génome qui seront ensuite transmises aux cellules filles (16), on parle alors de *transfert vertical*. Outre cette capacité qu'ont les bactéries à acquérir de nouveaux gènes ou de modifier leur génome pour s'adapter à leur environnement, les bactérie possède une résistance naturelle. Cette résistance intrinsèque est un phénomène naturel présent à l'échelle d'une espèce bactérienne et est indépendante de toute pression de sélection par les ATBs.

Les BGN présentent une résistance naturelle principalement causée par une imperméabilité importante associée à un efflux actif de molécules. Ces deux phénomènes s'opposent à l'accumulation intracellulaire d'ATBs, ce qui rend les BGN insensibles à de nombreux antimicrobiens efficaces sur les BGP.



**Figure 4 : Vue d'ensemble des mécanismes de résistance intrinsèques,** Adapté de Blair 2015 (17). La figure illustre l'exemple des ATBs de la famille des  $\beta$ -lactames qui ont pour cible une protéine de liaison à la pénicilline (PBP), inhibant ainsi la synthèse de la paroi bactérienne. L'ATB A pénètre dans la cellule via une protéine présente à la surface de la membrane externe constituant un canal hydrophile, appelée porine, lui permettant de rejoindre sa cible et d'inhiber la synthèse du peptidoglycane (PG). L'ATB B, pénètre de la même façon dans la cellule mais étant substrat de l'efflux il est rejeté dans le milieu extracellulaire avant d'atteindre sa cible. L'ATB C ne peut pas traverser la membrane externe, il ne peut donc pas rejoindre sa cible.

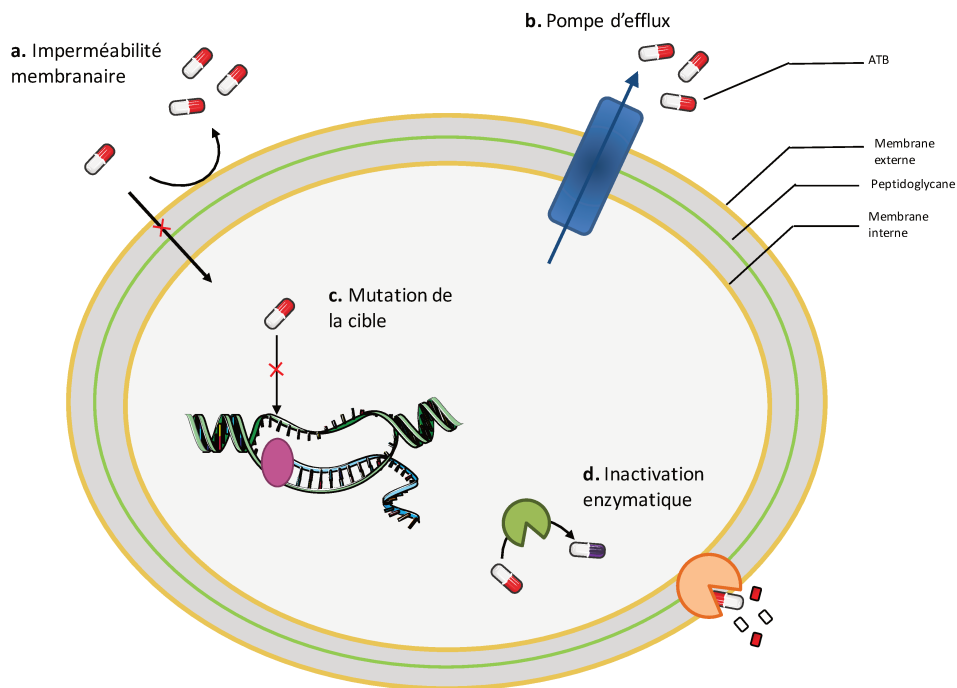
La membrane externe des BGN est à l'origine de cette imperméabilité. En effet, cette membrane est une bicouche lipidique asymétrique dont le feuillet externe est constitué d'un lipide polyanionique, le lipopolysaccharide (LPS) lui conférant en grande partie son caractère imperméable grâce à sa capacité à créer des interactions électrostatiques fortes entre les molécules par fixation des cations divalents  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (18). D'autre part, la chaîne hydrocarbonée du LPS présente une très faible fluidité, surtout chez les Entérobactéries (19), pour lesquelles les acides gras sont tous saturés, ce qui tend à diminuer le taux de diffusion transmembranaire des petites molécules hydrophobes telles que les macrolides. Seuls certains ATBs comme les polymyxines vont pouvoir interagir avec les charges négatives du LPS déstabilisant la membrane, et,

altérant ainsi son intégrité (18). D'ailleurs le traitement de la membrane externe des BGN, même avec de faibles concentrations de polymyxine-B-nonapeptide (PMBN), compromet son intégrité ce qui conduit à une augmentation drastique de la sensibilité aux ATBs hydrophobes tels que l'érythromycine, la novobiocine ou encore l'acide fusidique (20). La membrane externe joue donc un rôle incontestable dans la résistance des BGN à de nombreuses classes d'ATBs. Cependant, l'imperméabilité de la membrane externe n'est pas seule responsable de la résistance intrinsèque des BGN.

En effet, les pompes d'efflux contribuent également à cette résistance en raison de leur large spécificité de substrats, et leur surexpression dans un contexte de résistance acquise, confère un phénotype de multirésistance. Elles sont constituées de protéines ancrées dans la membrane, capables de prendre en charge des ATBs et des toxines et tendent à rabaisser la concentration intracellulaire sous le seuil toxique (21). Les pompes d'efflux présentant une relevance clinique importante sont regroupées en cinq familles et utilisent différentes sources d'énergie pour assurer leur fonctionnement. On distingue alors les transporteurs primaires qui utilisent l'ATP comme source d'énergie principale et les transporteurs secondaires dont le fonctionnement est dépendant d'un gradient électrochimique transmembranaire (22).



## 4.2 Les mécanismes de résistance des BGN



**Figure 5 : Mécanismes de résistance aux ATBs des BGN**, Adapté de *Allen 2010 (23)*. **a. Imperméabilité membranaire**. Certaines bactéries sont intrinsèquement résistantes à certaines classes d'ATBs car leur membrane est imperméable à la pénétration de ces molécules. **b. Pompes d'efflux**. Ces pompes rejettent les ATBs de la cellule bactérienne. **c. Résistance par mutation de la cible**. Des mutations modifient la protéine cible de l'ATB en affectant le site de liaison à l'ATB qui ne sera plus reconnu, mais la fonctionnalité de la protéine sera conservée. L'exemple illustré est celui d'une mutation au niveau de la sous-unité de l'ARN polymérase (en rose) qui provoque une résistance à la rifampicine notamment. **d. Inactivation enzymatique**. L'inactivation peut se faire par une modification chimique comme pour les aminosides rendus inactifs par une acétyltransférase (en vert), ou par dégradation de l'ATB par une enzyme telle que la  $\beta$ -lactamase (en orange) qui hydrolyse les  $\beta$ -lactames.

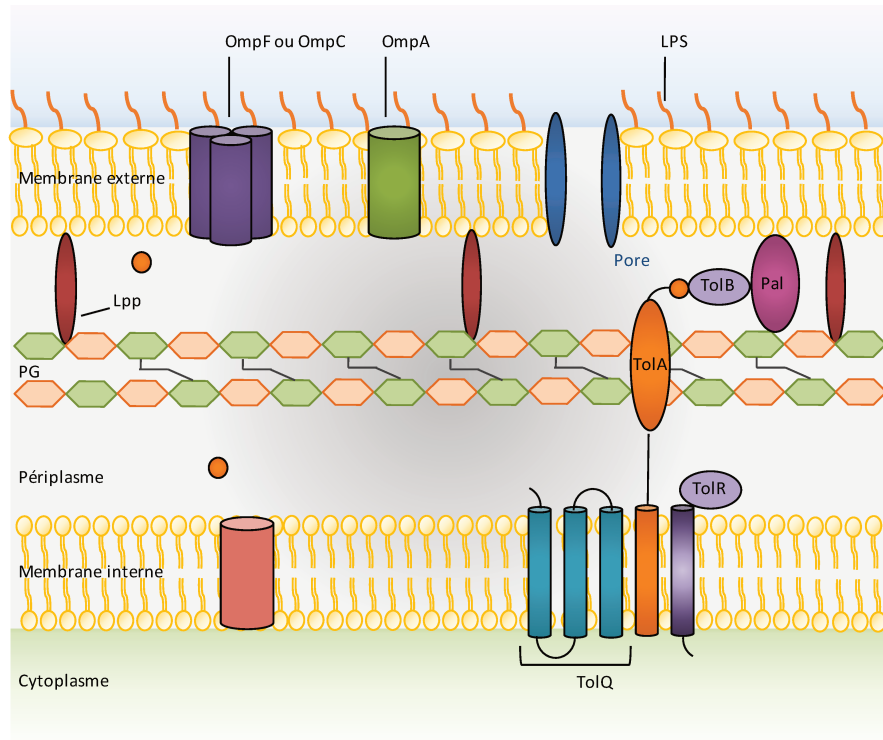
### 4.2.1 Mécanismes de résistance s'opposant à l'accumulation intracellulaire d'ATBs

Pour rejoindre leur cible et exercer leur action toxique, les ATBs doivent s'accumuler en concentration suffisante dans la cellule. Cela implique un équilibre entre l'influx et l'efflux de molécules antibactériennes (24). Or les deux paramètres qui constituent la résistance intrinsèque chez les BGN conduisent à la diminution de la concentration intracellulaire d'ATBs, et, peuvent être accentués par l'acquisition de gènes de résistance, par une surexpression des systèmes d'efflux ou encore par une mutation réduisant la perméabilité membranaire.

#### 4.2.1.1. *Imperméabilité membranaire*

##### a. Structure de la membrane des BGN : résistance intrinsèque

Comme présenté précédemment, les BGN possédant une membrane supplémentaire sont naturellement plus imperméables à de nombreuses classes d'ATBs (18). La membrane cytoplasmique et la membrane externe délimitent le compartiment périplasmique contenant le PG. Le PG est une macromolécule composée de long polymères de disaccharides d'acide N-acétyl-N-acétylmuramique (NAG-MNA), reliés par des ponts peptidiques qui contribue à la stabilité et à la résistance mécanique de l'enveloppe (25). La membrane cytoplasmique est une bicouche de phospholipides alors que la membrane externe est une bicouche asymétrique de phospholipides et de LPS. Les bicouches contenant du LPS sont plus rigides que celles contenant exclusivement des phospholipides, cela a pour conséquence de ralentir la diffusion passive des composés hydrophobes (26). Le LPS est composé de trois régions : le lipide A, le noyau d'oligosaccharides et l'antigène O. Néanmoins, des variations chimiques du lipide A font varier le niveau d'imperméabilité entre les différentes espèces. Par exemple, le lipide A d'*Escherichia coli* (*E. coli*) est majoritairement hexa-acylé alors que *P. aeruginosa* synthétise un lipide A à 75% penta-acylé et à 25% hexa-acylé (26) ce qui explique en partie sa très faible perméabilité membranaire, équivalente à environ 1/100<sup>ème</sup> de celle de *E. coli* (27). En raison de sa composition lipidique, la membrane externe est intrinsèquement imperméable aux molécules hydrophiles dont font partie les nutriments (18). Afin de pouvoir assurer leur absorption, la bactérie exprime des protéines appelées porines qui forment des canaux hydrophiles transmembranaires permettant par la même occasion le passage des petites molécules ATBs hydrophiles comme les  $\beta$ -lactames, les fluoroquinolones, les tétracyclines ou encore le chloramphénicol. Ces porines permettent ainsi de rendre la membrane semi-perméable (28). On distingue classiquement les porines générales dont font partie OmpC et OmpF d'*E. coli*, qui peuvent être distinguées des porines dites spécifiques par leur faible sélectivité et leur forte probabilité de présenter une conformation ouverte en l'absence de substrats spécifiques (29). D'autres espèces bactériennes comme *P. aeruginosa* produisent des porines spécifiques de faible perméabilité (28) et dont la sélectivité est une forme de résistance naturelle.



**Figure 6** : L'enveloppe cellulaire des BGN, Adapté de Blair 2015 (17)

b. Imperméabilité liée à la modification /perte des porines

Les porines jouent un rôle majeur dans la résistance aux ATBs puisqu'elles régulent l'influx de certaines molécules. En effet, certaines espèces bactériennes comme *P. aeruginosa* ou *A. baumannii* présentent une faible sensibilité naturelle aux  $\beta$ -lactames qui est une caractéristique associée au nombre réduit de porines et à leurs propriétés physico-chimiques spécifiques conduisant à une faible perméabilité membranaire (29). Outre ces propriétés naturelles, les bactéries sont capables : (i) de moduler l'expression de leurs porines ce qui peut conduire à une réduction du nombre de copies de porines dans leur membrane, voire à leur absence totale; (ii) de modifier leur sélectivité, altérant ainsi le taux de diffusion transmembranaire de certains ATBs (30) et (iii) de contrôler le type de porine exprimée. De nombreuses résistances dues à la perte de porines ont été rapportées dans la littérature comme par exemple la résistance aux carbapénèmes de *P. aeruginosa* causée par la perte de la porine OprD (31). Néanmoins une perte totale de porine affecte sévèrement le fitness de la bactérie car elle ne peut plus bénéficier d'un influx efficace de nutriments (32). Produire des porines mutées permet à la cellule bactérienne d'affecter suffisamment le comportement électrophysiologique de la porine pour bénéficier d'une diffusion limitée de certains ATBs comme les  $\beta$ -lactames (33)

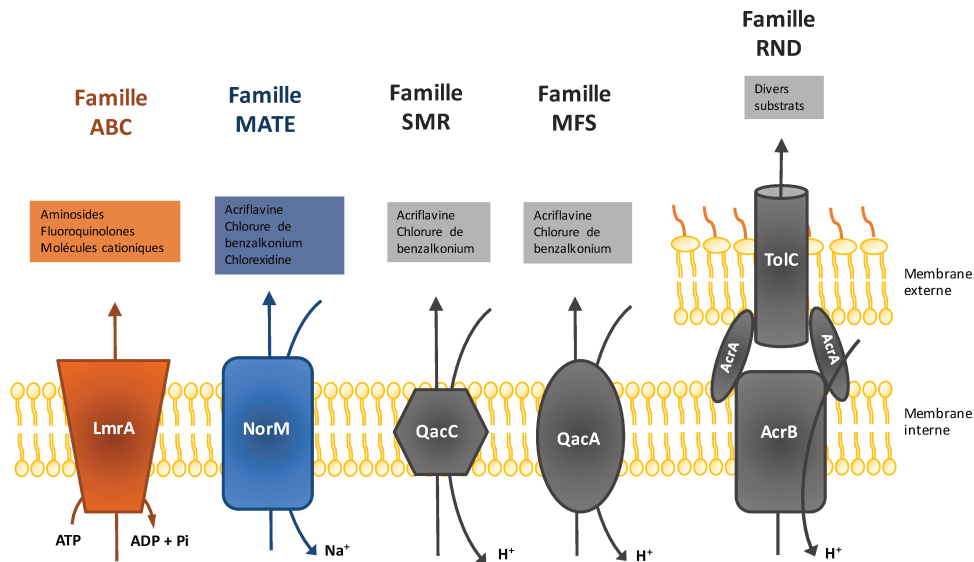
tout en conservant l'influx de nutriments nécessaires à sa survie. Enfin, la régulation de l'expression des porines permet à la bactérie de s'adapter à son environnement. En effet, chez *E.coli* par exemple, les porines OmpC et OmpF, permettant le passage de molécules hydrophiles d'une taille pouvant aller jusqu'à 600 Da, voient leur expression modulée en fonction de l'environnement (18). OmpF possédant un pore plus large que OmpC, les sels biliaires ou les ATBs vont l'emprunter plus facilement mais, *E. coli* va réprimer la production d'OmpF au profit d'OmpC lorsqu'elle se trouve dans un milieu où les concentrations de ces agents sont trop élevées (34), (32).

#### 4.2.1.2. *Pompes d'efflux*

Les pompes d'efflux sont des systèmes de détoxification cellulaire (35) ubiquitaires. En effet, des transporteurs ont été caractérisés aussi bien chez les procaryotes, les archées ou encore les eucaryotes supérieurs (36). Chez les bactéries, l'efflux a été décrit comme mécanisme de résistance pour la première fois en 1980 mettant en évidence une pompe d'efflux de la tétracycline codée par un gène plasmidique chez *E. coli* (37).

Les pompes d'efflux sont présentes à la fois chez les bactéries sensibles et résistantes et présentent une large spécificité de substrats (22). Par ailleurs, certains systèmes d'efflux sont inductibles par leurs substrats de sorte qu'une souche sensible peut surproduire des pompes d'efflux et devenir résistante (21). Par exemple, l'expression de la pompe d'efflux tripartite, MexXY-OprM de *P. aeruginosa* peut être induite par des ATBs qu'elle prend en charge tels que les tétracyclines ou encore les macrolides (38). Chez les mutants, la résistance par efflux peut résulter de deux mécanismes : (i) la surexpression de la pompe d'efflux (régulation), ou (ii) une substitution d'acide aminé qui rend la protéine mutée plus efficace à l'efflux (mutation). L'efflux est un mécanisme de transport actif qui utilise plusieurs sources d'énergie comme mentionné précédemment (cf. partie 4.1). Les études génomiques ont permis de classer les pompes d'efflux en cinq familles qui diffèrent selon leur organisation membranaire et la source d'énergie utilisée. Ainsi, on distingue la famille des ABC transporteurs « ATP Binding Cassette », la superfamille des « Major Facilitator » (MFS), la famille des « Small Multidrug Resistance » (SMR), la famille « Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE), et enfin, la famille des « Resistance Nodulation Division » (RND) (21). Notons que les pompes d'efflux ayant une relevance clinique importante dans l'établissement du phénotype MDR chez les BGN,

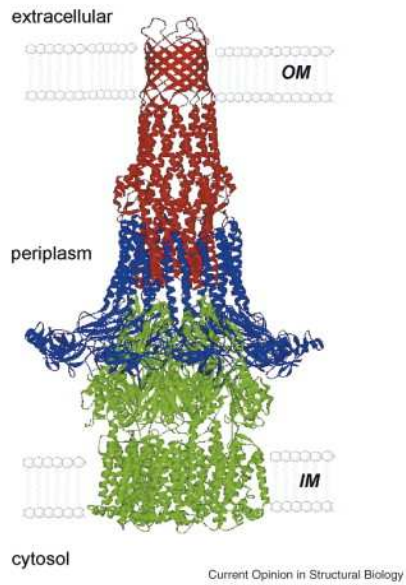
appartiennent toutes à la famille des transporteurs secondaires, c'est à dire utilisant un gradient électrochimique de protons ou de sodium à travers la membrane interne et plus particulièrement la famille des RND (21).



**Figure 7 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux des BGN (21)**

a. « Resistance Nodulation Division » (RND)

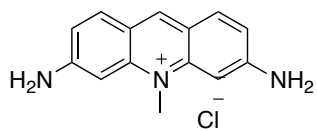
Les pompes de la famille RND sont constituées d'un système tripartite appartenant aux transporteurs secondaires car fonctionnant avec la force proton motrice (FPM) (22). Les systèmes les mieux décrits dans la littérature sont la pompe d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli* et MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*. Le complexe transmembranaire est formé par une protéine de la membrane interne (AcrB, MexB) qui utilise le gradient de protons pour effluer les substrats et s'assemble sous forme d'homotrimère (39), une protéine formant un canal à travers la membrane externe (TolC, OprM) qui est également un homotrimère (40), et une protéine de fusion membranaire (AcrA, MexA) formant un homodimère pouvant s'assembler en hexamère (41) et reliant les protéines localisées dans la membrane interne et externe.



Cette organisation permet de rejeter les substrats à la fois du cytoplasme et du périplasm directement vers l'extérieur de la cellule. Les pompes d'efflux de type RND présentent une large spécificité de substrats parmi lesquels on compte des ATBs, des sels biliaries, des détergents ou encore des colorants comme l'acriflavine qui a d'ailleurs donné son nom à la pompe d'*E coli* (42).

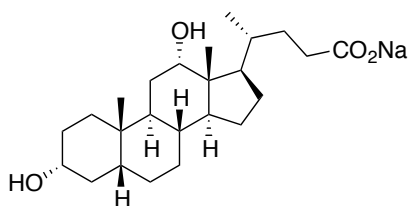
**Figure 8 :** Modèle d'assemblage d'une pompe d'efflux tripartite (43)

### COLORANTS



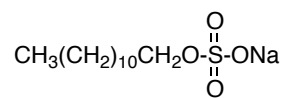
Acriflavine

### SELS BILIAIRES



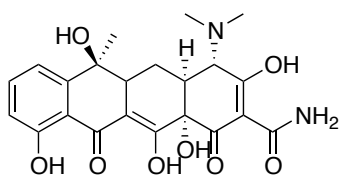
Désoxycholate de sodium

### DETERGENTS

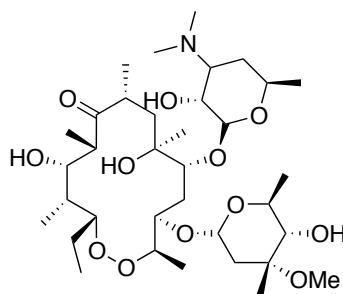


SDS

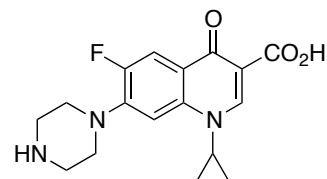
### ANTIBIOTIQUES



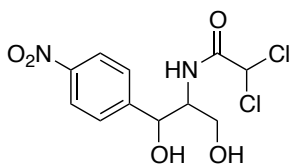
Tetracycline



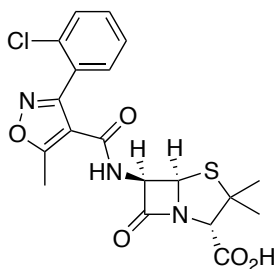
Erythromycine



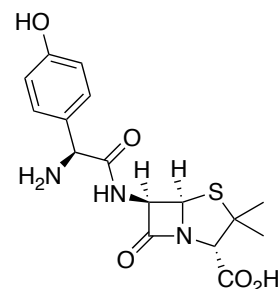
Ciprofloxacine



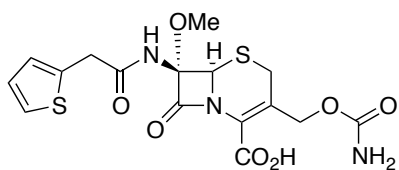
Chloramphénicol



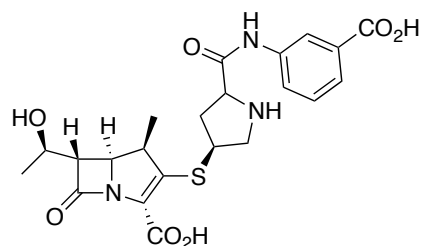
Cloxacilline



Amoxicilline



Céfotaxime



Ertapénème

**Figure 9 : Différents types de substrats des pompes d'efflux RND (42)**

D'autre part, les études de génomique comparative ont révélé un degré d'homologie de 70% entre la séquence des gènes codant la pompe, et une similarité de séquence d'acides aminés de plus de 80% entre les protéines composant la pompe RND au sein des différentes espèces bactériennes à Gram négatif telles que *E. coli* (*acrB/AcrB*), *P. aeruginosa* (*mexB/MexB*), *Campylobacter jejuni* (*cmeB/CmeB*) et *Neisseria gonorrhoeae* (*mtrD/MtrD*). L'organisation génétique en opéron des gènes codant la protéine de membrane interne et la protéine de fusion est également conservée à travers les espèces (21).

b. « Small Multidrug Resistance » (SMR)

Les pompes d'efflux SMR sont de petites protéines membranaires de 110 acides aminés environ, contenant 4 segments transmembranaires (STM) et énergisées par la PMF (30). Initialement, et en raison de leur petite taille il a été admis que les protéines SMR fonctionnaient sous forme de trimère (44). Des études plus récentes ont ensuite décrit que ces protéines formaient des hétérodimères qui s'assemblent sous forme tétramérique (45) ; mais cette étude n'a pas trouvé de consensus au sein de la communauté scientifique. L'absence d'une structure tridimensionnelle à haute résolution des protéines SMR comme ErmE donne lieu à un débat très controversé (46) néanmoins un consensus semble admettre l'existence d'hétérodimères pouvant s'associer sous forme de tétramère, cependant une structure sous forme d'homodimère peut également s'avérer fonctionnelle (47), (48). Ces protéines ont comme substrats, principalement des molécules lipophiles cationiques dont font partie certains détergents et ATBs. Ces transporteurs sont ainsi associés au phénomène de multirésistance. D'ailleurs dans les BGN il a été montré qu'ils peuvent agir en synergie avec d'autres transporteurs, en expulsant les composés dans le périplasme, qui seront ensuite pris en charge par les pompes de type RND (49). Les pompes d'efflux SMR les mieux caractérisées sont EmrE d'*E. coli* et les protéines Smr de *Staphylococcus aureus* (44).

c. « Multidrug and Toxic Compound Extrusion » (MATE)

Initialement considérées comme appartenant à la superfamille des « Major Facilitator » en raison de leurs homologies membranaires, les protéines appartenant à la



famille des transporteurs MATE sont désormais reconnues au sein d'une famille distincte (30). Ces protéines contiennent 450 acides aminés et 12 STM. Le premier transporteur MATE a été identifié chez *Vibrio parahaemolyticus*, la pompe NorM, et présente 57% d'identité et 88% de similitudes avec la protéine YdhE d'*E.coli* (50). Ces pompes d'efflux utilisent toutes le gradient de Na<sup>+</sup> pour effluer leurs substrats, parmi lesquels on retrouve principalement les fluoroquinolones, les aminosides et des molécules cationiques (51), (21).

d. Superfamille « Major Facilitator » (MFS)

Les analyses phylogénétiques de ces transporteurs ont permis de les regrouper en différentes familles, chacune assurant le symport, l'antiport ou l'uniport d'un substrat lui étant spécifique. Ainsi, la superfamille des MFS est impliquée dans le transport de métabolites, des sucres ou encore de molécules ATBs (52). Les protéines sont ancrées dans la membrane interne et utilisent le gradient de protons ou de sodium pour catalyser l'efflux de molécules (30). Les transporteurs MFS contiennent généralement 12 ou 14 STM. Ces pompes peuvent soit (i) fonctionner seules, comme la pompe NorA de *S. aureus* ou la pompe Tet de *E. coli*, mais également (ii), s'associer avec une protéine de fusion périplasmique et une protéine de la membrane externe chez les BGN pour former des pompes d'efflux tripartites, comme EmrAB-TolC chez *E. coli*, assurant ainsi directement un efflux du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule (53).

e. Superfamille des ABC transporteurs (ABC)

Ces transporteurs sont regroupés au sein d'une superfamille qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie et présentent une distribution ubiquitaire chez les eucaryotes et les procaryotes (54). Ils assurent le passage de molécules vitales (influx et efflux) comme les ions, les sucres les acides aminés, et également des protéines, (30), (55). Les transporteurs ABC sont constitués par des complexes multi-protéiques comprenant une protéine intégrale de membrane contenant 6 STM formant un pore à travers la membrane cytoplasmique et une protéine exerçant une activité ATPase du côté cytoplasmique. Chez les bactéries les systèmes sont le plus souvent associés sous forme de dimère et contiennent alors 12 STM alors que chez les eucaryotes

les domaines sont fusionnés et codés par un seul gène (56). Le transporteur d'efflux le mieux étudié chez les bactéries est celui de *Lactococcus lactis*, le système LmrA (57).

#### 4.2.2 Inactivation enzymatique

Les bactéries sont capables de produire des enzymes de modification ou de dégradation des ATBs. En effet, les enzymes peuvent affecter l'activité de l'ATB de plusieurs façons : (i) par hydrolyse, c'est le cas des  $\beta$ -lactamases, (ii) par transfert d'un groupement chimique rendant l'ATB inactif comme les acetyltransférases qui inactivent le chloramphénicol par exemple et enfin, (iii) il existe d'autres mécanismes qui peuvent mettre en jeu des réactions d'oxydo-réduction pouvant altérer un site de liaison de l'ATB à la cible (58).

Le mécanisme majeur de résistance enzymatique reste l'inactivation des  $\beta$ -lactames par les enzymes périplasmiques, les  $\beta$ -lactamases. Deux systèmes principaux de classification de  $\beta$ -lactamases coexistent : le premier est une classification moléculaire mis en place par Ambler en 1980 (59) et le deuxième est une classification dite fonctionnelle plus adaptée sur le plan clinique et développée par Bush un peu plus tard (60), (61). La classification d'Ambler identifie les grands groupes de  $\beta$ -lactamases au niveau moléculaire, et est basée sur l'étude relationnelle entre les séquences d'acides aminés et le substrat. Néanmoins l'établissement d'un profil type est délicat car le changement d'un seul acide aminé peut le modifier ce qui rend sa valeur clinique limitée. En revanche, la classification de Bush est basée sur les profils de substrats et contient 4 groupes : **1)** céphalosporinases (classe C d'Ambler), **2)** pénicillinases et les  $\beta$ -lactamases à large spectre inhibée par l'acide clavulanique (classe A et D d'Ambler), **3)** les métallob- $\beta$ -lactamases (classe B d'Ambler) et **4)** les  $\beta$ -lactamases non classifiées (58). Les gènes codant les  $\beta$ -lactamases sont le plus souvent portés par des plasmides, à l'exception de quelques-unes qui sont chromosomiques comme l'AmpC de *P. aeruginosa*. En outre, elles peuvent être exprimées de manière constitutive ou bien être inductibles par certains  $\beta$ -lactames (62). Afin d'outrepasser cette résistance naturelle causée par l'expression constitutive ou inductible d'une  $\beta$ -lactamase, plusieurs solutions sont possibles. La première consiste à utiliser, en combinaison avec les  $\beta$ -lactames, des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide-clavulanique ou le tazobactame par exemple, la seconde est de privilégier le recours aux  $\beta$ -lactames stables et tels que le céfépime et les carbapénèmes. Il existe néanmoins certaines  $\beta$ -lactamases comme les

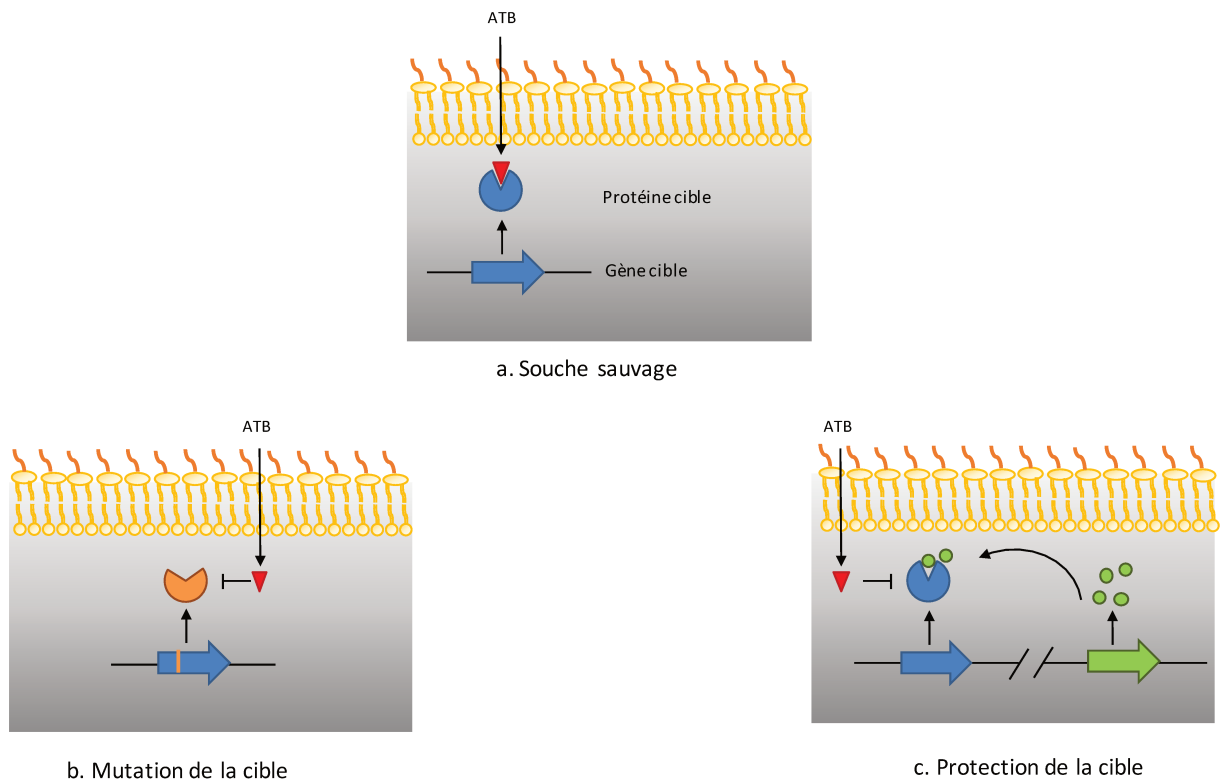
céphalosporinases chromosomiques qui demeurent insensibles à l'utilisation d'inhibiteurs. A l'inverse les  $\beta$ -lactamases à large spectre (BLSE) d'origine plasmidique y sont sensibles bien que des mutants résistants aient été décrits dans la littérature (63), (64). D'autres ATBs comme les macrolides peuvent également subir une hydrolyse. C'est le cas de l'érythromycine qui peut être rendue inactive par une enzyme clivant son cycle lactone (65).

Certains ATBs ne sont pas inactivés par hydrolyses mais subissent des substitutions chimiques. Les aminosides sont rendus inactifs par des O-phosphotransférases, des O-adenyltransférases ou des N-acétyltransférases dont l'action va empêcher la liaison de l'ATB à l'ARN ribosomal cible (66). Certains phénicolés comme le chloramphénicol, le thiamphénicol et l'azidamphénicol vont être inactivés par la chloramphénicol-acétyltransférase (CAT) qui va substituer le groupement hydroxyle en C3. La présence d'un atome de fluor en C3 protège le florfenicol de l'action de cette enzyme (67).

#### **4.2.3 Altération / protection de la cible**

La plupart des ATBs se lient spécifiquement à leur cible avec une haute affinité. La modification de cette cible peut conduire à une absence de sa reconnaissance par l'ATB ce qui va conférer une résistance à la bactérie tout en préservant l'activité de la protéine. Ce mécanisme de résistance permet à une bactérie de résister à tous les ATBs d'une même classe. Un exemple de ce mécanisme est la résistance aux fluoroquinolones causée par une mutation de leurs cibles : la gyrase (mutation dans le gène *gyrA*) et de la topoisomérase IV (mutation dans le gène *parC*) impliquées dans la topologie de l'ADN (68). Un autre exemple d'un changement de cible est l'acquisition d'un gène homologue à celui qui code la protéine originale codant une protéine modifiée pour laquelle l'ATB a moins d'affinité. Dans le cas de la résistance à la methicilline de *S. aureus*. L'acquisition de la cassette de résistance mec comprend le gène *mecA*, celui-ci code pour la protéine modifiée PBP2a ce qui la rend insensible aux  $\beta$ -lactames mais tout à fait capable d'assurer son rôle indispensable dans la biosynthèse de la paroi bactérienne (69). La protection de la cible est également un mécanisme de résistance pouvant être mis en jeu par les bactéries et qui ne nécessite pas de processus mutationnel. Les protéines cytoplasmiques TetO et TetM par exemple, réduisent la sensibilité du

ribosome aux tétracyclines en se fixant préférentiellement au ribosome car elles possèdent des similitudes avec des facteurs d'élongation (70).



**Figure 10 : Altération de cible** Adapté de Blair 2015 (17). **a.** Protéine sauvage capable de lier l'ATB qui exercera son action toxique. **b.** Mutation de la cible, par exemple mutation dans les gènes codant les topoisomérases conférant une résistance aux fluoroquinolones chez plusieurs espèces ou production d'une protéine modifiée pour laquelle la cible a perdu son affinité, comme pour les PBP modifiées. **c.** Protection de la cible comme pour le ribosome par des protéines empêchant la fixation des tétracyclines.

## II. ANTIBIOTIQUES ET MEDECINE VETERINAIRE D'ELEVAGE

### 1. Utilisation des ATBs en médecine vétérinaire

Le marché de l'ATB en santé animale représente 15 à 20% du marché des médicaments vétérinaires et s'élève à 813 millions d'euros en France, 4,3 milliards d'euros en Europe et à plus de 17,5 milliards de dollars dans le monde (71). A l'inverse de leur usage en médecine humaine, l'utilisation des ATBs en médecine vétérinaire et particulièrement dans les élevages se décline en 4 utilisations principales : (i) *usage curatif* une fois la maladie déclarée, (ii) usage *méthaphylaxique* qui est un usage intermédiaire entre le curatif et préventif, (iii) usage préventif appelé *prophylaxique* et enfin (iv) usage zootechnique, c'est-à-dire comme *facteur de croissance* (72).

#### 1.1 Antibiothérapie

L'antibiothérapie consiste en un *usage curatif* des ATBs, c'est-à-dire pour *soigner une maladie déclarée* pour laquelle une charge bactérienne est importante. Les modes d'utilisation des agents antimicrobiens à des fins thérapeutiques diffèrent selon la taille des animaux malades et aussi selon la taille de l'élevage. La principale différence de la médecine d'élevage est qu'il s'agit d'une *médecine collective* et non d'une médecine individuelle qui est réservée aux animaux domestiques et aux animaux utilisés pour le sport ou les loisirs, comme les chevaux par exemple (72). Parmi les animaux producteurs de denrées alimentaires, le traitement individuel des animaux est pratiqué presque uniquement chez les vaches laitières et les veaux, et dans ce cas la démarche est similaire à celle utilisée pour traiter les humains (examen clinique pouvant comprendre des analyses biologiques tels que l'identification du pathogène et de sa sensibilité aux antimicrobiens, administration du traitement *per os* ou par injection aux animaux symptomatiques uniquement, et, la dose administrée est appropriée et non standardisée). De manière générale, le traitement individuel chez des animaux producteurs de denrées alimentaires est impossible car les animaux sont souvent regroupés au sein d'importants troupeaux pouvant contenir jusqu'à 30 000 poulets ou une centaine de porcs par exemple. Dans ce cas le traitement de l'ensemble du troupeau

est préconisé et il peut se faire par l'administration d'ATBs directement dans l'eau de boisson ou dans la nourriture dès l'identification d'un cas symptomatique ou malade. Cette administration reste la plus répandue bien que l'assimilation des ATBs puisse ne pas se faire de manière homogène à travers l'ensemble des animaux, en effet, les animaux malades ont tendance à moins s'alimenter.

Concernant *le choix de l'ATB*, l'approche vétérinaire à l'inverse de l'approche humaine reste bien souvent probabiliste. En effet, les vétérinaires se basent souvent uniquement sur l'examen clinique et la reconnaissance des symptômes et la bactérie la plus fréquemment responsable de ces derniers pour administrer le traitement ATB et rarement sur un prélèvement afin d'identifier le pathogène impliqué. De plus le recours à l'antibiogramme n'est pas non plus une pratique réalisée en première intention car elle a un coût non négligeable et surtout retarde la mise en place du traitement, il existe donc un consensus qui place cette pratique en seconde, voire en troisième intention en cas d'échec thérapeutique (73). Néanmoins, il est préconisé aux vétérinaires de conduire des diagnostics étiologiques les plus précis possibles afin de recourir à des ATBs à spectre étroit qui n'agiraient que sur le pathogène et non la flore commensale afin de limiter les résistances (74).

## 1.2 Métaphylaxie

L'administration d'ATBs à la totalité de l'élevage alors que seule *une partie des animaux présentent des symptômes de la maladie*, mais qu'il est prévu que la majorité voire la totalité du groupe devienne malade (la charge bactérienne est encore faible), est appelée la métaphylaxie. Cette pratique permet de limiter le nombre d'animaux malades et morts avec des quantités d'antimicrobiens plus faibles que si la totalité de l'élevage était touchée. La métaphylaxie est mise en œuvre dès qu'une infection contagieuse se déclare et que 10 à 15% des animaux du lots sont malades, elle *combine ainsi la thérapeutique et la prévention*. Ainsi cela permet de limiter les dépenses de traitement mais également de diminuer les coûts liés aux pertes de productivité qui seraient engendrées par la perte d'animaux.

### 1.3 Antibioprophylaxie

Contrairement à l'antibiothérapie ou à la métaphylaxie, la prophylaxie est pratiquée à **titre préventif** et peut se faire à l'échelle de l'individu ou du troupeau. Comme chez l'homme où elle est souvent utilisée en prévention en vue d'une chirurgie par exemple. Dans l'industrie agroalimentaire de bœufs et de porcs, le recours à la prophylaxie se fait à des moments clefs de la production tels que le sevrage ou la mise en commun d'animaux provenant de différents troupeaux par exemple. Même si à ce moment-là les animaux ne sont pas malades, l'expérience a montré qu'ils avaient de grandes chances de contracter des maladies respiratoires et/ou digestives à ces moments critiques de leur développement. La prophylaxie apparaît donc comme un moyen de garantir la santé animale tout en assurant la rentabilité de la production. Néanmoins, cette pratique est très controversée car elle serait une des causes principales de la sélection de bactéries résistantes. En effet, les variations génétiques naturelles des différentes souches bactériennes confèrent des résistances aux ATBs et donc un avantage de survie à la souche mutée. En présence d'ATBs, l'avantage de la mutation peut être transféré par échange de plasmide à la population bactérienne ce qui conduit donc à la sélection des bactéries résistantes dans le milieu.

### 1.4 Facteurs de croissance

Les ATBs sont également utilisés comme promoteurs de croissance durant toute la période d'élevage. Cette utilisation est réservée uniquement aux animaux producteurs de denrées alimentaires et concerne essentiellement les élevages porcins et avicoles. Les ATBs sont alors administrés en *concentration sub-inhibitrice afin de stimuler la croissance*.

Depuis 1975 l'utilisation des tétracyclines et des  $\beta$ -lactames comme facteurs de croissance est interdite en Europe mais reste autorisée aux Etats-Unis. En 2006 la Commission européenne a interdit l'utilisation des ATBs promoteurs de croissance mais en 1999 elle avait déjà réduit à 4 le nombre d'ATBs pouvant être utilisés comme tels : Monensine (E714), Salinomycine (E716), Avilamycine (E717) et Flavophospholipole (E712) (75), (73) alors qu'aux Etats-Unis de nombreux ATBs sont encore largement

utilisés (73) et cela malgré les mises en garde et les recommandations dictées par les agences nationales.

Cette pratique était liée à l'intensification des élevages mais l'administration de doses sub-thérapeutiques a rapidement été reconnue comme un facteur de risque de l'antibiorésistance par augmentation de la pression de sélection, avec une préoccupation particulière lorsque ces additifs étaient proches structurellement des ATBs utilisés en médecine humaine (71).

Dans le cadre de ma thèse CIFRE, la société Virbac souhaitait que l'on s'intéresse particulièrement à *l'antibiothérapie utilisée dans les élevages porcins* car ils représentent un marché très important. Les pertes de productivité les plus importantes sont attribuées aux infections respiratoires. Ces infections impliquent des BGN, parmi les plus prévalentes et les plus problématiques on compte : *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* qui ont fait l'objet d'étude durant ma thèse et *Haemophilus parasuis*.

## **2. Bactéries responsables d'infection respiratoires chez le porc**

### **2.1 *Bordetella bronchiseptica***

Le genre *Bordetella* regroupe 9 espèces appartenant à la classe des  $\beta$ -protéobactéries de l'ordre des *Burkholderiales* de la famille des *Alcaligenaceae* ; parmi elles *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica* sont très proches d'un point de vue génétique et sont considérées comme des sous-espèces (76). *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont les agents responsables de la coqueluche chez l'homme, et *B. bronchiseptica* est un pathogène du tractus respiratoire de nombreux mammifères (77). Au niveau biochimique, tous les membres du genre sont non-fermentaires et ne produisent ni indole ni sulfure d'hydrogène, mais produisent tous une cytochrome oxydase, une lysine décarboxylase et une catalase (77). De croissance lente (36 à 48 heures pour obtenir des colonies bien isolées) et optimale à 35°C en milieu Columbia, *B. bronchiseptica* est un bacille à Gram négatif aérobie stricte, mobile grâce à un flagelle péritriche (78). La bactérie est asacharolytique, c'est-à-dire qu'elle ne métabolise pas les sucres présents dans son environnement mais utilise d'autres sources de carbone



pour sa survie et sa multiplication tels que des intermédiaires du cycle de KREBS (succinate, citrate,  $\alpha$ -kétoglutarate, fumarate, lactate et oxalo-acétate), des molécules organiques (acide-pyruvique, acétate) et enfin, des acides aminés (proline, glutamate, glutamine et tyrosine) (79). *B. bronchiseptica* est l'agent de « la toux de chenil » du chien (80), de la rhinite atrophique du porc (81), (82) et peut également être une zoonose (83), (84), (85). Les trois principales espèces de *Bordetella* contrôlent leur virulence grâce à un système à deux composants : le locus *bvgAS* dont le signal de transduction fait intervenir 4 étapes de phosphorylation successives His-Asp-His-Asp (Figure 9A) (86), (87). BvgA est une protéine de 23kDa qui constitue le régulateur de réponse (88) et possède un motif hélice-tour-hélice au niveau de son C-terminal (89), tandis que BvgS est une protéine transmembranaire de 135kDa constituant le senseur autokinase du système. Il possède trois domaines putatifs de perception de signaux, deux domaines périplasmiques « Venus Flytrap » (VFT), reliés par un STM à un domaine PAS (Per-ARNT-Sim) cytoplasmique qui fait la jonction avec l'histidine kinase (90). Les protéines BvgA et BvgS de *B. pertussis* présentent respectivement 100% et 96% d'homologies avec leurs homologues chez *B. bronchiseptica*. Ce système BvgAS permet de moduler le phénotype de la bactérie en 3 phases (Figure 9B) :

- **Bvg<sup>+</sup>** : mode X, virulent, elle survient à 35-37°C, elle est nécessaire et suffisante pour établir une pathogénie dans les modèles animaux (91).
- **Bvg<sup>i</sup>** : mode I, intermédiaire, la bactérie ne produit pas ses facteurs de virulence mais exprime des antigènes spécifiques, cette phase semble être importante pour la transmission.
- **Bvg<sup>-</sup>** : mode C, avirulent, cette phase induite par certains modulateurs chimiques (sulfate de magnésium : MgSO<sub>4</sub>) ou à basse température (<26°C) se caractérise par une absence de production des facteurs de virulence et par la transcription des gènes du locus *vrg* chez *B. pertussis* et des gènes codant le flagelle chez *B. bronchiseptica*. Cette phase aurait un rôle crucial dans la survie à long terme chez l'hôte (92).

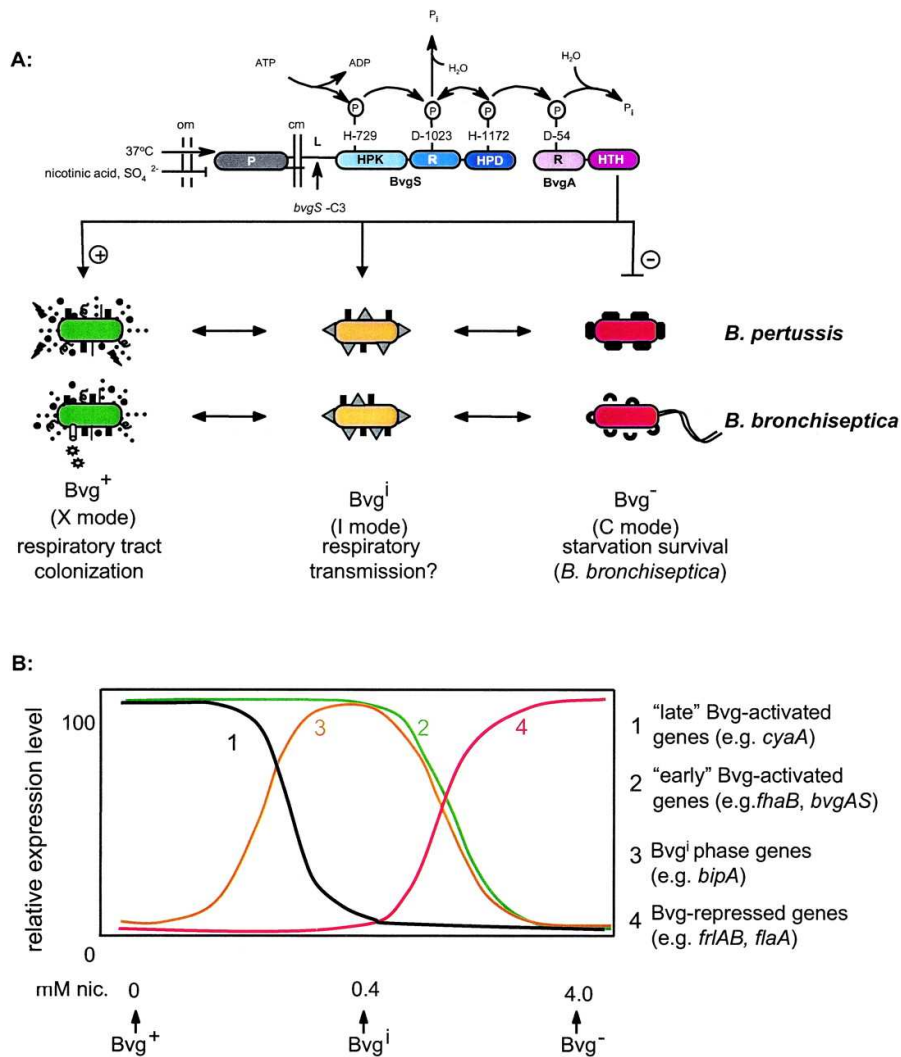
Grâce au système BvgAS, la bactérie peut percevoir des stimuli particuliers tels que le changement de température ou encore la présence de certaines molécules dans le milieu et transmettre les signaux de ces conditions extérieures afin qu'ils puissent être interprétés au niveau génétique et ainsi provoquer une pathogénicité. BvgAS contrôle ainsi 4 classes de gènes (Figure 9B) (90), (93):

- **Gènes de classe 1** : ces gènes sont exprimés le plus tardivement après l'entrée en phase de virulence, on retrouve essentiellement des gènes codant des toxines comme la toxine pertussique (PTX) chez *B. pertussis* ou encore l'adénylate cyclase hémolytique (CyaA). Ces gènes sont qualifiés de tardifs et leur expression se fait lorsqu'une grande quantité de BvgA est phosphorylée.
- **Gènes de classe 2** : ces gènes sont activés avec des quantités de BvgA moins importantes que les gènes de classe 1 donc leur expression est induite rapidement dès l'entrée en phase de virulence, ils sont également exprimés en phase Bvg<sup>i</sup>. En effet les promoteurs de ces gènes contiennent les sites de fixation de haute affinité du régulateur BvgA ce qui explique que de faibles quantités soient nécessaires. Cette classe de gènes comprend des gènes d'adhésines mais le locus de du système BvgAS appartient aussi à cette classe.
- **Gènes de classe 3** : cette classe est mixte car elle contient à la fois des sites de haute affinité qui seront plus rapidement remplis et donc induiront l'expression de cette classe de gènes (gènes de la phase Bvg<sup>i</sup>), mais également des sites de basse affinité qui mettrons plus de temps pour atteindre une concentration en BvgA phosphorylé suffisante, ce qui réduira l'expression des gènes de la phase Bvg<sup>+</sup>.
- **Gènes de classe 4** : ces gènes sont exprimés lorsque la phase de virulence est réprimée, c'est-à-dire pendant la phase Bvg<sup>-</sup>. Ce sont les gènes *vgr* dont le rôle est peu connu, chez *B. pertussis* ils sont majoritairement devenus des pseudo-gènes alors que chez *B. bronchiseptica* ils participent à la survie de la bactérie dans l'hôte et dans l'environnement.

Parmi les facteurs de virulence les plus importants on retrouve des adhésines, des toxines et d'autres déterminants et tous ne sont pas nécessairement sous le contrôle du système BvgAS :

- **Adhésines** :
  - **Hémagglutinine filamenteuse (FHA)** qui est l'adhésine majoritaire, requise pour la colonisation, très immunogène elle est d'ailleurs utilisée comme composant primaire des vaccins acellulaires contre *B. pertussis*.
  - **Fimbriae (FIM)**, aussi nommés pili, ils sont impliqués dans la persistance de la colonisation trachéale.

- **Autotransporteurs** : le principal, la **pertactine (PRN)** est une protéine de surface qui permet l'adhésion aux intégrines et notamment aux cellules épithéliales, elle participe également à augmenter la protection vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte (94).
- **Toxines** :
  - **Adénylate cyclase (CyaA)** aussi appelée hémolysine, elle interagit avec les voies de signalisation des cellules hôtes via la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), son domaine N-terminal possède le domaine catalytique adénylate cyclase dont l'activité est modulée par la calmoduline (95).
  - **Système de sécrétion de type III (SST3)** permet à la bactérie de transférer des effecteurs directement dans la cellule hôte, participe également dans la persistance de la colonisation trachéale (93).
  - **Toxine dermonécrotique (DNT)** est une protéine cytoplasmique libérée lors de la lyse bactérienne, induit une nécrose *in vitro* elle active le facteur Rho par déamination ou polyamination en rendant son expression constitutive (96).
  - **Toxine cytotrachéale (TCT)** est un disaccharide issu de la dégradation du peptidoglycane, elle va causer des dommages aux cellules ciliées, un gonflement des mitochondries ainsi que des bourgeonnements cytoplasmiques à la fois chez les cellules ciliées et non ciliées (97).
  - **Lipopolysaccharide (LPS)** : aussi nommée endotoxine, le lipide A correspond à la partie toxique et se retrouve relargué lors de la lyse bactérienne. De plus il peut être modifié au cours des phases de virulence notamment au niveau de l'antigène O qui n'est produit qu'en phase Bvg<sup>-</sup> (98).
- **Déterminants additionnels** :
  - **Flagelle** : péritriche, produit uniquement chez *B. bronchiseptica* pendant la phase Bvg (99), permet la mobilité, hautement antigénique, son expression ectopique altérerait son interaction avec l'hôte (100) mais, paradoxalement, il a été montré que son expression était indispensable pour assurer la survie et le maintien de la bactérie dans le tractus respiratoire (92), et qu'il aurait un rôle crucial dans les phases initiales de l'infection (101).
  - **Alcaligine** : sidérophore permettant de complexer le fer permettant ainsi son absorption, rôle très important pour la survie des bactéries dans leur hôte, notamment chez les porcs (102), la production d'alcaligine est indépendant de BvgAS (103).



**Figure 11 : La régulation de la virulence chez *B. bronchiseptica*.** **A.** Phospho-relais BvgAS. BvgS est le senseur du système, BvgA est le régulateur de réponse. Lors de la détection d'un signal inducteur, BvgS s'autophosphoryle et initie le phospho-relais ce qui conduit éventuellement à la phosphorylation de BvgA et à son activation. Le système BvgAS contrôle 3 phases phénotypiques en réponse aux conditions environnementales. La phase Bvg<sup>+</sup> correspond à la phase où les facteurs de virulence sont exprimés, la phase Bvg<sup>i</sup> est caractérisée par l'expression de certains facteurs, d'ailleurs les gènes de classe 3 sont exprimés au maximum exclusivement pendant cette phase, comme le gène *bipA* impliqué dans l'invasion, la phase Bvg<sup>-</sup> de *B. bronchiseptica* est nécessaire pour la survie de la bactérie en condition de carences nutritives et dans sa survie dans l'environnement. **B.** Les courbes d'expression des quatre classes de gènes régulées par BvgAS.

## 2.2 *Pasteurella multocida*

*P. multocida* a été identifiée pour la première fois par Louis Pasteur en 1881 comme étant l'agent pathogène du choléra des poules. Déjà, il avait identifié que certaines souches ne présentaient pas la même virulence car l'inoculation expérimentale ne conduisait pas systématiquement à la mort de l'animal infecté (104). *P. multocida* est un coccobacille à Gram négatif de petite taille appartenant à la classe des  $\gamma$ -protéobactérie de l'ordre des *Pasteurellales* de la famille des *Pasteurellaceae*, pléomorphe et non flagellé. La plupart des isolats sont catalase, oxydase, indole et ornithine décarboxylase positifs, ils sont également capables de fermenter le sucrose, le glucose et le maltose. *P. multocida* est aérobie ou anaérobie facultative et a une croissance optimale en Muller Hinton II (ajusté en cations divalents) supplémenté par 5% de sang de cheval défibriné et en présence de 20 $\mu$ g/ml de  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide ( $\beta$ -NAD) à 35-37°C. Le facteur V, aussi appelé coenzyme I ( $\beta$ -NAD) n'est pas essentiel pour la croissance de la bactérie à l'image du genre *Haemophilus*, mais son ajout dans le milieu de culture est recommandé par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) depuis 2014. Les différents isolats de *P. multocida* sont classifiés en fonction du sérotypage de leur capsule de polysaccharides en 5 groupes :

- **Sérotype A** : capsule composée d'acide hyaluronique (105), (106)
- **Sérotype B** : capsule composée d'arabinose, de mannose et de galactose, (106), (107)
- **Sérotype D** : capsule composée d'héparine (106), (108)
- **Sérotype E** : composition de la capsule non caractérisée
- **Sérotype F** : capsule composée de chondroïtine (109), (110)

Les isolats sont également sous-typés en fonction de leur LPS ce qui permet de distinguer 16 sérovars différents (111), (112), (113).

*P. multocida* est à la fois un micro-organisme commensal et un pathogène opportuniste qui a été retrouvé chez de nombreux animaux sauvages et domestiques. En effet, il a notamment été trouvé dans le tractus respiratoire de poules, (114), de dindes (115), d'oiseaux sauvages (116), (117), de bovins (118), de bisons (119), de porcs (112), (120) ou encore de chiens et de chats (121), (122). Les manifestations cliniques d'une infection à *P. multocida* sont diverses et peuvent aller de l'absence de symptôme, à l'inflammation des voies respiratoires supérieures chroniques légères, voire à une

maladie aiguë souvent mortelle. Le syndrome prédominant de pasteurellose chez le porc est une maladie des voies respiratoires supérieures qui se manifeste sous forme de rhinite atrophique. Ces infections sont souvent associées à d'autres pathogènes, notamment *B. bronchiseptica* (123), (124), (125), (126) ou encore *Mycoplasma hyopneumoniae* (127). Une pneumonie ou une rhinite atrophique asymptomatique causée par *P. multocida* est souvent associée au type capsulaire A non-toxinogène (128), (129). Les souches de type capsulaire D et certaines souches de type capsulaire A causent, à l'inverse, des rhinites atrophiques associées à des symptômes graves tels que des pertes de poids, des retards de croissance et parfois la mort chez le porc et le lapin (130), (131), (132), (133). Le premier symptôme qui apparaît chez ces espèces est la distorsion du museau caractéristique de la rhinite atrophique qui est la manifestation de la réabsorption osseuse des os du cornet nasal. L'infection peut ensuite se développer en une maladie plus grave, provoquant une atteinte sévère des structures osseuses (septum nasal écarté, raccourcissement du museau, écoulements nasaux et oculaires) (134), (135), (136). *P. multocida* est également impliquée dans d'autres infections touchant des animaux et est également une zoonose, c'est-à-dire une infection pouvant se transmettre à l'homme. En effet, une infection à *P. multocida* peut causer des septicémies hémorragiques chez les bovins (137), la transmission à l'homme se fait généralement par contact avec un animal infecté par une morsure ou par contact des sécrétions nasales ou de la salive sur une plaie par exemple (122), (138), (139). Les symptômes de morsures chez l'homme se traduisent par une inflammation (œdème) à l'endroit de la morsure pouvant s'accompagner d'exsudats purulents au niveau de la plaie (122), (139), (140), dans les cas les plus graves, la pasteurellose peut rapidement évoluer vers une bactériémie (141) et d'autres complications telles que l'ostéomyélite (140), (142), (143), l'endocardite (144), (145) ou encore la méningite (140), (146). En revanche, les cas d'infections respiratoires chez l'homme sont rares exceptés chez les patients atteints de maladies respiratoires chroniques (147), (134), (149).

Afin que l'infection puisse s'établir, il est impératif pour la bactérie de pouvoir acquérir suffisamment de nutriments pour assurer sa croissance et sa réplication tout en évitant le système immunitaire de l'hôte. Durant les derniers stades de l'infection, *P. multocida* va modifier l'expression de certains gènes impliqués dans son métabolisme énergétique lui permettant ainsi de moduler l'absorption de certains nutriments, tels que le fer ou les acides aminés en fonction du milieu dans lequel elle se trouve (150). En

fonction de son pouvoir pathogène, la bactérie peut également libérer des toxines qui vont accentuer la gravité de l'infection. La virulence de *P. multocida* met donc en jeu plusieurs facteurs :

- **Acquisition des nutriments** : les souches virulentes de *P. multocida* sécrètent souvent des enzymes hydrolytiques, telle que des hyaluronidases (151) ou des sialidases qui seraient impliquées dans l'assimilation de nutriments.

- **Acquisition du fer** : le fer est un nutriment essentiel pour les bactéries. Due à son insolubilité et à sa toxicité le fer ferrique est généralement lié à diverses protéines telles que la transferrine, la lactoferrine, la ferritine ou l'hème dans les tissus hôtes (150). Cette complexation du fer avec des protéines diminue grandement sa biodisponibilité pour les bactéries. Afin d'assurer sa survie dans l'hôte, *P. multocida* va modifier son profil d'expression génétique en réponse aux carences en fer et augmenter l'expression de certains gènes impliqués dans la liaison et le transport du fer (152), (153).

- **Composants de surface** :

- **LPS** : il peut se présenter sous deux glycoformes, A et B, qui diffèrent structurellement au niveau de leur noyau alors que la partie antigénique varie fortement entre les souches et a permis de déterminer 16 sérovars différents (154), (155). De ce fait, le LPS constitue un antigène, ce qui va induire une réponse immunitaire sérovar-spécifique chez l'hôte (155). Une étude a montré le rôle majeur du LPS dans la virulence de *P. multocida*, effectivement des souches présentant un LPS muté ont une virulence atténuée (142).

- **Capsule** : elle permet à la bactérie de se protéger contre les réactions immunitaires de l'hôte en inhibant à la fois la phagocytose et son opsonisation par le complément (157), (158). L'absence de la capsule restaure la sensibilité des souches à l'action bactéricide du sérum de poulets (157).

- **Protéines de la membrane externe (PME)** : Elles ne représentent pas des facteurs essentiels de la virulence de *P. multocida* cependant plusieurs études ont montré qu'elles jouaient néanmoins un rôle dans l'établissement de la pathogénicité de la bactérie (159), (160). En effet, certaines adhésines seraient impliquées dans la colonisation de l'hôte (112). C'est le cas par exemple de OmpA qui permet de lier des protéines de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine (161).

- **Toxine** : La toxine de *P. multocida* n'a été identifiée que pour deux types capsulaires, A et D (133). Cette toxine est une protéine de 146kDa codée par le gène

*toxA* porté par un bactériophage lysogénique putatif (162). Elle appartient à la famille des toxines dermo-nécrotiques et est responsable de la résorption osseuse des fosses nasales dans la rhinite atrophique, de la nécrose hépatique, de l'atrophie de la rate, du gonflement des reins, de la pneumonie, de la perte de poids et enfin du retard de croissance (163). D'autre part, en raison des propriétés mitogéniques, anti-apoptotique et prolifératives de la toxine sur certaines lignées cellulaires, des hypothèses émises ont mis en relief son rôle potentiel dans la prédisposition au cancer comme conséquence d'une infection à *P. multocida* (163), (164).

### 2.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

En 1957, Pattison *et al* isolent une bactérie de lésions de pleuropneumonie porcine qui sera appelée Haemophilus-like avant d'être nommée *Haemophilus pleuropneumoniae* (165). En 1978 Bertschinger et Seifert décrivent un microorganisme ressemblant à *Pasteurella haemolytica*, (166), responsable de pleuropneumonies nécrotiques identiques à celle causées par *Haemophilus pleuropneumoniae* en se basant sur la description de Shope de 1964 (167). Ce n'est qu'en 1983, que les travaux de Pohl (168) basés sur les analogies phénotypiques et par hybridation ADN-ADN, ont montré que ces deux bactéries appartiennent à une unique espèce très proche d'*Actinobacillus lignieresii* et très éloignée du genre *Haemophilus*. Ces données ont conduit les chercheurs à proposer une nouvelle espèce *A. pleuropneumoniae* comprenant deux biotypes. Le biotype 1 précédemment identifié comme étant *H. pleuropneumoniae* pour sa dépendance au facteur V (169) et le biotype 2 qui est capable de synthétiser du NAD en présence de nucléotides pyridines ou de leurs précurseurs (170), est donc NAD-indépendante comme la souche isolée par Bertschinger. Pour le biotype 1, treize sérotypes ont été identifiés contre seulement six pour le biotype 2 (171) en fonction des antigènes présents à la surface du LPS et des polysaccharides capsulaires (172). D'un point de vue phénotypique, *A. pleuropneumoniae* se présente sous la forme d'un petit coccobacille ou d'un petit bacille à Gram négatif pléomorphe, non sporulé pouvant être isolé, ou à l'inverse pouvant se retrouver par paires ou en chaînes plus ou moins courtes. Tous les isolats fermentent les carbohydrates et présentent un métabolisme anaérobie facultatif, ils possèdent généralement tous une oxydase et une uréase, bien que des variants uréases négatifs aient été trouvés, ils sont tous hémolytiques (173) et réduisent les nitrates en nitrite (174). *A. pleuropneumoniae* a longtemps été considérée comme



non mobile et non flagellée, mais en 2003 Negrete-Abascal *et al* ont démontré la présence de flagelles et leur relevance pour la mobilité (175). L'expression des flagelles n'est stimulée que dans certaines conditions, notamment de température (37°C) et après 48h à 72h d'incubation, qui sont les conditions retrouvées lors de l'infection de l'hôte (175). La croissance d'*A. pleuropneumoniae* est optimale en gélose chocolat polyvitex à 35-37°C en atmosphère microaérophile mais sa culture en milieu liquide demeure fastidieuse.

*A. pleuropneumoniae* est considéré comme un parasite obligatoire du tractus respiratoire du porc (176) et il n'y a pas d'autres hôtes naturels connus car l'organisme ne survit pas longtemps dans l'environnement (176). La bactérie est néanmoins un agent infectieux majeur des élevages porcins, responsable de pleuropneumonies touchant en général les porcelets ou les porcs âgés de plus de 12 semaines durant la phase d'engraissement. La transmission se fait par contacts directs des animaux infectés ou par aérosols (177), (178). La maladie peut se manifester sous différentes formes en fonction du sérotype, de l'état immunitaire de l'hôte et du nombre de bactéries qui rejoignent les poumons (179), (180). :

- La forme suraiguë / aiguë se traduit par l'apparition de signes cliniques tels qu'une hyperthermie, une augmentation de la fréquence respiratoire, des dyspnées plus ou moins graves pouvant aller jusqu'à la cyanose, de l'anorexie, des vomissements et une diarrhée (173), (176). Des lésions pulmonaires sont également associées à ces deux formes de la maladie et sont caractérisées par des œdèmes inflammatoires ainsi qu'une hémorragie et une nécrose des tissus (181), (182).

- La forme chronique suit la phase aiguë, la fièvre n'est pas nécessairement observée cependant on note un retard de croissance des animaux infectés et une toux peut persister (173).

A l'image de nombreux pathogènes, la virulence d'*A. pleuropneumoniae* est multifactorielle :

○ **Capsule**, elle permet de déterminer les différents sérotypes et les différences de sa composition permettraient d'expliquer les variations de virulence (183). De plus elle protège la bactérie contre les défenses immunitaires de l'hôte en prévenant la phagocytose (184).

○ **Facteur de virulence impliqués dans l'adhésion**

▪ **Fimbriae de type 4**, ils sont connus pour être impliqués dans l'adhérence de différents pathogènes. Leur présence chez *A. pleuropneumoniae* a été mise en évidence ce qui suggère leur rôle possible dans la liaison aux cellules épithéliales (185).

▪ **LPS**, son rôle dans l'adhésion au mucus trachéal a longtemps été discuté (186) mais une étude utilisant des souches mutées au niveau de la structure du LPS a confirmé son rôle dans l'adhésion (187).

▪ **Adhésines**, des études de protéomique ont permis d'identifier une protéine similaire à YadA impliquée dans l'adhésion et l'invasion de *Yersinia* (188).

○ **Acquisition des nutriments** : le tractus respiratoire contient peu de nutriments permettant d'assurer une croissance bactérienne. Ainsi, *A. pleuropneumoniae* a mis en place différents mécanismes afin de pallier le manque d'éléments nutritifs. En effet, la bactérie est capable d'induire la lyse de cellules afin de récupérer les nutriments relargués dans le milieu *via* la sécrétion de toxines notamment (189) .

○ **Acquisition du fer** : Comme pour *P. multocida*, il est essentiel pour *A. pleuropneumoniae* de pouvoir assimiler du fer soit directement *via* les protéines liant le fer soluble comme la transferrine ou *via* des récepteurs ou encore par l'hémoglobine circulante. Une étude a d'ailleurs mis en évidence que le LPS, par l'intermédiaire du lipide A était capable de lier l'hémoglobine (190). Par ailleurs, une étude de transcriptomique menée par Deslandes *et al* en 2007 a permis de mettre en évidence une surexpression des gènes impliqués dans la liaison et le transport du fer en condition de carence en fer et à l'inverse une expression diminuée des gènes codant des protéines contenant des clusters fer-soufre (191).

○ **Toxines** : initialement 3 types d'endotoxines (hémolysines) ont été identifiés chez *A. pleuropneumoniae*, **ApxI**, **ApxII** et **ApxIII** (192). Toutes les souches virulentes d'*A. pleuropneumoniae* sécrètent au moins une ou deux de ces toxines (193). La libération de ces toxines peut provoquer la lyse de plusieurs types cellulaires tels que les cellules épithéliales, endothéliales, les neutrophiles ou encore les macrophages (189). Ces toxines appartiennent à la famille des RTX (repeats in the structural toxin), elles présentent des séquences répétées riches en glycine qui agissent en s'insérant dans les membranes et formant des pores (173). En 1999 une quatrième toxine a été identifiée, **ApxIV** dont la synthèse est induite durant l'infection *in vivo* (194), cependant l'expression du gène *apxIV* est régulée positivement *in vitro* par contact avec les fluides

broncho-alvéolaires (195). ApxIV semble jouer un rôle essentiel dans la virulence de la bactérie (196) bien que son activité hémolytique soit plus faible que celle de ses homologues. D'autre part, le **LPS**, *via* le lipide A, exerce une activité immunostimulante en activant la production de cytokines inflammatoires induisant ainsi des nécroses aux niveau des cellules épithéliales, (187), (197).

○ **Flagelle**, leur présence ainsi que leur rôle dans la mobilité d'*A. pleuropneumoniae* a été démontré, cependant leur implication dans la pathogénicité et leur rôle exact dans la survie de la bactérie dans l'hôte reste à élucider (175) .

### **3. Résistance aux ATB utilisés en médecine vétérinaire**

#### **3.1 Résistance aux tétracyclines**

Les tétracyclines sont des ATBs bactériostatiques qui inhibent la synthèse des protéines bactérienne en empêchant l'association des aminoacyl-ARNt avec le ribosome bactérien (198). La résistance aux tétracyclines peut se faire par deux mécanismes principaux que sont l'efflux actif et la protection du ribosome, bien qu'un gène *tetX* codant pour une protéine cytoplasmique inactivant les tétracyclines en présence d'oxygène ait été identifié mais seulement chez les *Bacteroides* qui est un genre anaérobie stricte.

Les pompes d'efflux conférant une résistance spécifique aux tétracyclines appartiennent à la famille des MFS. Chaque gène d'efflux code pour une protéine membranaire d'environ 46kDa qui permet à la bactérie de résister à la tétracycline mais pas à la minocycline ni aux glycylycylcine. Ces protéines sont au nombre de 17 et ont été divisées en 6 groupes en fonction de leur séquence d'acides aminés (70). Parmi ces protéines d'efflux on retrouve Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G) ou encore Tet(K) et Tet(L), elles peuvent contenir 12 ou 14 STM. Par ailleurs les tétracyclines peuvent également prises en charge par des pompes d'efflux de type RND à large spectre telles que MexAB-OprM et MexXY-OprM chez *P. aeruginosa* par exemple (49), (199).

Il existe également 9 protéines cytoplasmiques qui sont capables de protéger le ribosome de l'action de la tétracycline, mais également de la doxycycline et de la minocycline. Ces protéines présentent des similarités avec les facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G notamment au niveau de leur N-terminal (200) qui contient le site de liaison

au GTP (70). Les protéines de protection du ribosome les mieux étudiées sont Tet(M) et Tet(O) et présentent une activité GTPase ribosome-dépendante (201).

A ces deux mécanismes de résistance principaux vient s'ajouter l'imperméabilité naturelle des BGN. Des mutations conduisant à une réduction de production de OmpF ont conduit à une augmentation de la résistance à la tétracycline chez *E. coli*, et il se pourrait qu'une mutation dans l'opéron *marRAB* induisent une surproduction des pompes d'efflux mais également à une régulation négative de l'influx *via* OmpF (202).

### 3.2 Résistances aux macrolides, lincosamide et streptogramines (MLS)

Les macrolides, lincosamides et streptogramines sont des ATBs chimiquement distincts mais ayant des modes d'action similaires et un spectre d'action commun, ils ont été regroupés sous le sigle MLS. De plus, ils présentent un même profil pharmacocinétique et possèdent des résistances croisées. Ils agissent tous sur la synthèse protéique bactérienne par fixation au niveau de la sous-unité 50S du ribosome et peuvent être bactériostatiques ou bactéricides selon la dose et l'espèce considérées.

La résistance aux macrolides et aux lincosamides chez les BGN est d'abord basée sur leur perméabilité réduite, notamment chez les *Enterobacteriaceae*, les espèces *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (203). Néanmoins plusieurs mécanismes sont également à l'origine de résistances acquises, telle que la modification de la cible par des ARN méthylases. Ces enzymes sont souvent produites par un gène *erm*, porté sur un plasmide ou un transposon dont le produit va engendrer une méthylation spécifique d'un résidu adénine (A2058) dans une région conservée de l'ARN ribosomal (ARNr) 23S (204) ce qui va conférer une résistance croisée aux MLS. Trois types d'enzymes, que sont des hydrolases, des estérases et des transférases, sont également impliquées dans la résistance aux MLS par modification de leur structure chimique ce qui les rend inactifs (11). La plupart de ces enzymes sont portées par des plasmides (11). Une autre enzyme, l'ARN méthyltransférase Cfr initialement identifiée sur un plasmide de *Staphylococcus sciuri* pour conférer une résistance aux phénicolés (205), modifie le site de liaison au ribosome par une méthylation du résidu A2503 de la sous-unité 23S de l'ARNr (206) conduit en réalité à la résistance d'autres ATBs telle que la clindamycine (206) mais également aux lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilines, et à la streptogramine A, à la fois chez *S. aureus* et *E. coli* (207). Une mutation de la sous-unité 23S de l'ARNr

au niveau du résidu A2058 a été identifié chez *Mycobacterium intracellulare* (208) et chez *Helicobacter pylori* (209) pour conférer une résistance à la clarithromycine. Chez *Campylobacter* une mutation de la sous-unité 23S de l'ARNr a également été identifiée au niveau du résidu A2075 comme conférant une résistance aux macrolides (210). Dans cette même étude les auteurs ont également mis en évidence le rôle de la pompe d'efflux CmeABC dans la résistance aux macrolides. Dans le cas de la méthylation ou de la mutation, la région affectée est toujours la même, il s'agit de la boucle peptidyl-tranfèrase qui semble être fortement impliquée dans la liaison avec l'ATB. D'autre part, différents transporteurs ont été identifiés pour conférer une résistance aux MLS. Certaines protéines comme Mef(A) ou Mef(E) présentent une homologie avec les transporteurs MFS et d'autres comme Msr(A), Msr(B) ou encore Car(A) sont des membres présumés de la famille des ABC transporteurs (211).

### 3.3 Résistances aux $\beta$ -lactames

Les  $\beta$ -lactames exercent leur activité antibactérienne en se liant aux PLP et inhibant les réactions de trans-peptidations. Le mécanisme de résistance majeur est l'inactivation enzymatique par la production de  $\beta$ -lactamases. Comme expliqué précédemment (Cf. chapitre 1, section 4.2.2) les  $\beta$ -lactamases sont classées en 4 groupes en fonction de leur substrat et de leur sensibilité à l'acide-clavulanique. Chez les BGN, les enzymes sont sécrétées dans le périplasme où elles exercent leur activité alors que les BGP les sécrètent en dehors de la cellule. Ces enzymes sont généralement inductibles mais peuvent dans certains cas être exprimées constitutivement (62). La résistance aux  $\beta$ -lactames peut également se faire par acquisition de PLP résistantes et ainsi conduire à une résistance à la méticilline chez *S. aureus* mais également aux céphalosporines, aux carbapénèmes et monobactames (SARM). Le gène codant les PLP modifiées a été retrouvé sur une cassette chromosomique de 52kpb, la cassette SSCmec (69). Des protéines PLP ayant une faible affinité pour les  $\beta$ -lactames ont également été identifiées chez *Enterococcus* (212) et *Streptococcus* (213). A ces mécanismes de résistance spécifiques, s'ajoutent une résistance par réduction de l'influx chez les BGN. Observée chez *E. coli*, *E. aerogenes* et chez *P. aeruginosa* par modification, altération ou délétion des porines (31), (33), (214). Les pompes d'efflux tripartites de type RND sont

également capables d'exporter les  $\beta$ -lactames telles que AcrAB-TolC d'*E.coli* et de *Klebsiella pneumoniae* ou MexAB-OprM de *P.aeruginosa* (42).

### 3.4 Résistance aux sulfamides et triméthoprime

Les sulfamides sont des dérivés de l'acide para-amino benzène qui est un substrat nécessaire à la synthèse de l'acide folique (vitamine B9), la cellule ne va pas le différencier et donc va l'intégrer dans son métabolisme ce qui va bloquer les voies métaboliques par compétition avec la dihydroptéroate synthase (DHPS). Le triméthoprime inhibe l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR) qui catalyse la synthèse de la vitamine B9, elle-même nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques et donc des acides nucléiques (11). En raison de leurs mécanismes d'action étroitement liés, la combinaison des deux a montré un effet synergique ce qui explique qu'ils soient souvent associés (215).

La résistance acquise aux sulfamides est due principalement à la synthèse de deux enzymes dihydroptéroate synthase (DHPS) insensibles aux sulfamides. Ces enzymes sont codées par les gènes *sulI* et *sulIII* qui sont portés par des plasmides et des transposons (216) et ont été retrouvés chez plusieurs BGN (11), (216), (217). En revanche la résistance plasmidique au triméthoprime est représentée par une vingtaine de gènes *dfr* codant des DHFR résistantes (218) qui ont été retrouvés à la fois chez des BGN et des BGP notamment chez *S. aureus* porteur du gène *dfrA* retrouvé sur le transposon Tn4003 codant une DHFR ayant une faible affinité pour le triméthoprime (219). Des mutations chromosomiques peuvent également être à l'origine de résistance aux sulfamides et triméthoprime. En effet, une mutation des gènes codant la DHPS ou la DHFR (gène *dfr*) peuvent réduire l'affinité des enzymes pour les sulfamides et le triméthoprime respectivement. Des mutations conduisant à une surproduction de DHFR peuvent également conduire à une résistance au triméthoprime (220). Certaines espèces bactériennes présentent une résistance naturelle aux sulfamides et triméthoprime par leur imperméabilité comme *P. aeruginosa*. D'autres bactéries comme les entérocoques ou les lactobacilles ont la capacité d'utiliser des folates exogènes, et d'autres produisent des DHFR présentant naturellement une affinité faible pour le triméthoprime comme les genres *Clostridium*, *Neisseria*, *Brucella* ou encore les *Bacteroides* (11).



### 3.5 Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des ATBs qui empêchent la molécule d'ADN de se répliquer en ciblant l'ADN gyrase et les topoisomérases IV. Les résistances les plus courantes sont la mutation de la cible et la diminution intracellulaire d'ATB. De nombreuses mutations dans la région nommée QRDR « Quinolone Resistance-Determining Region », à la fois des gènes *gyrA* et *gyrB* codant l'ADN gyrase ou encore des gènes *parC* et *parD* codant pour la topoisomérase IV ont été rapportées que ce soit chez les BGN ou les BGP (221). La diminution de la concentration intracellulaire implique à la fois les systèmes d'efflux mais également une diminution de l'influx. La diminution de l'influx est attribuée chez les BGN à une régulation négative de la production de la porine OmpF médiée par le régulateur *mar* (202), (222). Contrairement à l'influx, l'efflux est un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones commun aux BGN et aux BGP. En effet, il a été rapportée chez de nombreuses espèces telles que *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium avec AcrAB-TolC, (223), *P. aeruginosa* avec MexAB-OprM et MexCD-OprJ, ou encore chez *S. aureus* avec la pompe d'efflux de type MFS, NorA (224).

A ces mécanismes de résistances viennent s'ajouter des résistances portées par des supports plasmidiques et codant des différentes protéines. Le gène *qnr*, identifié pour la première fois chez *K. pneumoniae* code une protéine, QrnA responsable de la protection de la cible (225). On peut également retrouver des acétyltransférases portées par des plasmides responsables de l'inactivation enzymatiques des fluoroquinolones. C'est le cas par exemple du variant *cr aac(6')-Ib* qui code une aminoside acétyltransférase responsable d'une diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine du variant (225). Enfin certains plasmides portent également un gène *qepA* codant une protéine d'efflux présentant de fortes similitudes avec des protéines appartenant à la famille des MFS. La présence de ce gène confère une résistance à la ciprofloxacine et à la norfloxacine (225).

### 3.6 Résistance aux aminosides

Les aminosides furent parmi les premières molécules ATBs identifiées comme étant produites naturellement par les bactéries, en particulier par les espèces de *Streptomyces* qui produisent la kanamycine, la streptomycine, la spectinomycine, la



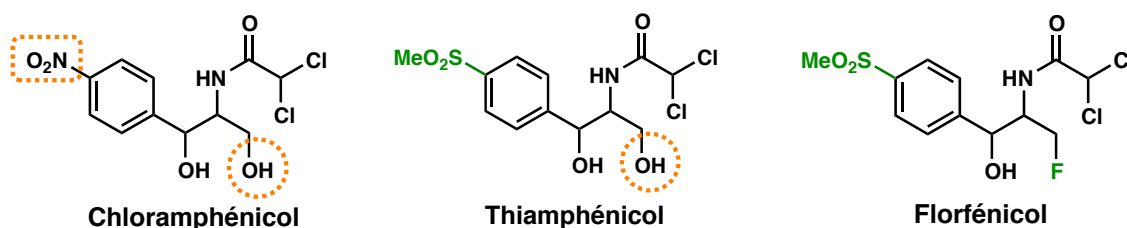
tobramycine ou encore la néomycine, et les espèces de *Micromonas* qui synthétisent notamment la gentamycine (226). Les aminosides sont des ATBs bactéricides qui ont pour cible la synthèse protéique bactérienne. Ils exercent leur activité en se liant à l'ARNr 16S de la petite sous-unité 30S du ribosome, au niveau du site A (site de décodage), cette liaison induit des erreurs dans la lecture des codons ce qui va produire des protéines aberrantes qui vont s'insérer dans la membrane et ainsi compromettre l'intégrité de la paroi (226), (227). La résistance principale des aminosides est basée sur l'inactivation enzymatique de ces ATBs par les N-acétyltransférases (AAC), O- adényltransférases (ANT) et les O-phosphotranférases (APH) (228). Ce mécanisme de résistance concerne aussi bien les BGN que les BGP (66), et les gènes codant ces enzymes sont généralement retrouvés au sein d'un intégron ou d'une cassette de résistance mais peuvent être également portés par des plasmides, (227) ce qui assure une dissémination efficace à travers les différentes espèces. D'ailleurs un gène codant une enzyme (AAC(3)-IV) qui avait initialement été identifié comme conférant une résistance à l'apramycine, un ATB réservé à la médecine vétérinaire, a été retrouvé chez des isolats cliniques d'Entérobactéries (229). L'étude a mis en évidence la dissémination du plasmide portant le gène de l'enzyme de l'animal vers le milieu hospitalier. Chez *Mycobacterium tuberculosis*, la mutation de la protéine S12 de l'ARNr 16S est le mécanisme de résistance majeur à la streptomycine (226) mais une altération de la cible par méthylation a également été rapporté comme mécanisme de résistance chez d'autres bactéries telles que les Enterobactéries, les *Actinomycetes* ou encore chez d'autres bacilles à Gram négatifs (226). La méthylation confère une résistance à l'ensemble des aminosides, les gènes codant ces 16S-méthylases sont souvent portés par des plasmides. Une diminution de l'absorption des aminosides par mutation du LPS ou modification des charges du LPS constitue également une résistance respectivement chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (11). Les aminosides sont également substrats de l'efflux, notamment de la pompe RND MexXY-OprM de *P. aeruginosa* (230) ou encore de la pompe AcrD d'*E. coli* (231).

### **3.7 Résistance au chloramphénicol et au florfénicol**

Le chloramphénicol et le florfénicol sont des ATBs à large spectre, bactériostatiques qui agissent sur la synthèse des protéines et particulièrement sur

l'inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique. Le chloramphénicol va lier de manière réversible la peptidyltransférase au niveau de l'ARNr 23S de la sous unité 50S du ribosome bactérien. Bien que les phénicolés n'agissent pas sur le ribosome eucaryote 80S, il est reconnu que le chloramphénicol interagit avec le ribosome mitochondrial car il présente une structure similaire au ribosome 70S bactérien, ce qui explique en partie la toxicité de l'ATB (67). Cette toxicité relative rend son utilisation en médecine humaine restreinte à certaines infections telles que les méningites causées par *Haemophilus influenzae* ou *Neisseria meningitidis* dans les cas d'allergie à la pénicilline par exemple, car il diffuse facilement dans le sang et les tissus (67). Son utilisation en médecine vétérinaire est limitée aux animaux de compagnie mais est interdite chez les animaux producteurs de denrée depuis 1994 afin de protéger le consommateur de certains effets néfastes pouvant provenir de résidus dans les carcasses animales. En raison de l'anémie aplasique irréversible indépendante de la dose ingérée chez l'homme, le NOEL du chloramphénicol ne peut être déterminé ce qui a eu pour conséquence le retrait de son utilisation. Ces effets secondaires néfastes n'ont cependant pas été observés avec l'analogue fluoré du thiamphénicol, le florfénicol et l'Union Européenne a autorisé son utilisation pour le bétail en 1995 et dans les élevages de porcs en 2000 où il est largement utilisé pour traiter les infections respiratoires, depuis il est également utilisé dans d'autres domaines de la médecine vétérinaire.

Le mécanisme de résistance au chloramphénicol est l'inactivation enzymatique par la chloramphénicol acétyl-transférase (CAT). L'enzyme est également capable d'inactiver le thiamphénicol et l'azidamphénicol. Le remplacement du groupement hydroxyle en C3 par un résidu de fluor rend le site accepteur de l'acétyle structurellement altéré, ce qui protège le florfénicol de l'action de la CAT (Figure 10), (232).



**Figure 12 :** Structure chimiques des principaux ATBs phénicolés. Le thiamphénicol est l'analogue du chloramphénicol, il possède un groupement méthyle-sulfonyle en position 4 du phényle à la place du groupement nitro. Le florfénicol est l'analogue fluoré en C3 du thiamphénicol.

Le groupement hydroxyle en C3 est susceptible d'être méthylé par la CAT. Un fois l'ATB méthylé, il devient inactif.

On distingue deux classes de CAT qui diffèrent selon leur structure, le type A et le type B. En dépit de leurs différences de séquences nucléotidiques, les gènes *catA* possèdent des acides aminés conservés, notamment ceux impliqués dans la liaison du substrat, l'activité ou encore l'arrangement des monomères et leur assemblage en trimères (233). Par ailleurs, les gènes *catB*, aussi retrouvés sous le nom de gène *xat* pour acétyltransférase xénobiotiques, possèdent des séquences nucléotidiques distinctes des gènes *catA* mais les protéines CATs de type B conservent néanmoins une structure d'homotrimère où chaque sous-unité comprend entre 207 et 238 acides aminés, comme leurs homologues de la classe A (233). Les gènes *catA* retrouvés chez de nombreuses espèces telles que *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, sont des gènes plasmidiques inductibles par le chloramphénicol (234) alors que les gènes *cat* retrouvés chez *Clostridium*, *Haemophilus*, *Pasteurella* ou encore chez les Entérobactéries se trouvent sur des transposons et sont exprimés constitutivement. Les gènes *catB* ont été retrouvés essentiellement sur des transposons d'*E. coli*, de *Morganella morganii* mais également sur le chromosome de *P. aeruginosa* (11).

Le chloramphénicol est également le substrat de nombreuses pompes d'efflux RND, tels que AcrAB-TolC des Entérobactéries (235) ou encore de MexAB-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN de *P. aeruginosa* (236). Il existe également des transporteurs spécifiques du chloramphénicol et du florfénilcol. En effet, les gènes *cmlA* et *cmlB* initialement identifiés chez *P. aeruginosa* codent des protéines d'efflux de type MFS conférant une résistance spécifique au chloramphénicol (237). Depuis ces gènes ont été retrouvés chez d'autres espèces comme *Salmonella enterica* serovar Agona (238), *A. baumannii* (239) ou encore chez *B. bronchiseptica* (240). Par contre, les gènes tels que *pp-flo* et *floR* codent pour des systèmes d'efflux qui exportent à la fois le chloramphénicol et le florfénilcol. Ces gènes ont été décrits comme étant portés par des plasmides, le premier a été identifié chez *Pasteurella piscida*, mais ils ont été retrouvés plus tard chez d'autres espèces telles que *E. coli* (241), (242) et également chez *S. enterica* serotype Thyphimurium (243) où la localisation du gène est chromosomique. Un nouveau gène *fexA*, codant une protéine de 475 acides aminés possédant 14 STM a été identifié sur un plasmide de *Staphylococcus lentus* (244) et confère une résistance inductible au chloramphénicol et au florfénilcol. Plus récemment, une étude de

métagénomique fonctionnelle a permis d'identifier un gène *pexA* responsable d'un phénotype de résistance au florfénicol. La protéine PexA présente une structure similaire aux pompes d'efflux appartenant à la famille des MFS (245).

Jusqu'à là, la seule résistance croisée entre le chloramphénicol et le florfénicol que l'on avait identifiée était donc une résistance par efflux. Mais une étude de métagénomique conduite en 2012, a permis la découverte d'un gène *estDL136*, qui code pour une chloramphénicol acétate estérase et qui est capable d'inactiver le chloramphénicol et le florfénicol (246). Si dans cette étude le produit d'hydrolyse du chloramphénicol a été identifié comme étant du p-nitrophénylesérinole par chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse (LC-MS), la structure de l'hydrolysate du florfénicol n'a pu être déterminée.

### **III. SOLUTIONS POUR LUTTER CONTRE L'ANTIBIORESISTANCE**

Compte-tenu du nombre croissant de pathogènes résistants et multirésistants aux ATBs auxquels nous devons faire face, la mise en place de stratégies pour lutter contre le problème de l'antibiorésistance est inévitable. Le groupe de travail transatlantique sur la résistance aux antimicrobiens (TATFAR) a ainsi souligné les besoins les plus urgents qui sont (i) de prévenir les infections résistantes et (ii) de développer des stratégies pour améliorer le « pipeline » de nouveaux antimicrobiens.

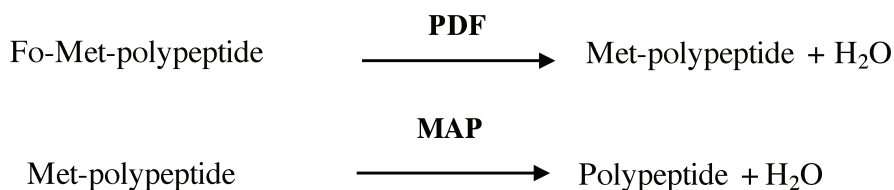
#### **1. Découverte de nouveaux médicaments**

##### **1.1 Nouvelles molécules**

Une des stratégies pour répondre au phénomène d'antibiorésistance est le développement de nouvelles molécules. Cette approche peut être menée de deux façons distinctes. La première consiste à améliorer une structure déjà existante et à la modifier de façon à ce qu'elle échappe aux mécanismes de résistance spécifiques que la bactérie a développé tout en conservant son activité sur la cible. C'est la stratégie qui a permis l'évolution des  $\beta$ -lactames (247). Malgré tout, des résistances à l'imipénème, une carbapénème de dernière génération, ont notamment été rapportées chez *E. aerogenes* (248), (249). La deuxième stratégie consiste à identifier de nouvelles cibles spécifiques afin d'esquiver les mécanismes de résistance existants. La difficulté de cette stratégie réside dans l'identification de processus cellulaires vitaux pour lesquels des molécules n'ont pas encore été identifiées et entraînant leur inhibition. Il est généralement admis qu'une cible doit remplir les critères suivants : (i) être présente dans la plupart des pathogènes humains afin que l'inhibiteur puisse avoir un large spectre d'activité, (ii) être absente des cellules humaines, (iii) faire partie d'une voie essentielle pour la bactérie, (iv) ne pas être inhibée par les ATBs utilisés, (v) être hautement spécifique vis-à-vis de l'agent pathogène et non toxique pour l'homme et enfin (vi) ne pas entraîner l'acquisition rapide de résistances.

Ainsi, de récentes études ayant permis la caractérisation de la peptide déformylase (PDF) ont permis de considérer cette enzyme comme nouvelle cible. L'enzyme PDF est essentielle chez *E. coli* car elle permet l'action de la methionine aminopeptidase (MAP)

afin d'obtenir des polypeptides matures (Cf. Figure 11). Bien que plusieurs classes d'ATBs aient été décrites comme inhibiteurs de la synthèse protéique bactérienne (tétracycline, chloramphénicol etc.) aucun antimicrobien capable d'agir sur les modifications post-traductionnelles des protéines ne fut découvert avant que Chen et *al* n'identifient l'actinonine comme inhibiteur de la PDF en 2000 (250).



**Figure 13 :** Réactions catalysées par la PDF et la MAP (251)

La division cellulaire représente également une cible intéressante car elle implique sept protéines essentielles qui sont bien conservées chez les bactéries et qui sont absentes chez l'homme. Des études menées par Stokes et *al* ont permis d'identifier un inhibiteur de la protéine FtsZ qui joue un rôle crucial dans la formation du septum lors de la division cellulaire (252).

Malgré les efforts déployés afin d'identifier de nouvelles cibles ainsi que leurs inhibiteurs, peu de nouvelles molécules arrivent en phase de développement et cela est souvent dû aux problèmes de toxicité sur les cellules eucaryotes ou à de mauvais paramètres de pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) (253). Ce constat contraint les acteurs de la recherche et du développement à repenser les stratégies thérapeutiques et à se diriger vers des thérapies alternatives et/ou combinatoires.

## 1.2 Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des ATBs naturels produits par divers organismes tels que les mammifères, les arthropodes, les plantes et les bactéries. Les peptides antimicrobiens sont regroupés en 4 classes : (i) peptides anioniques, (ii) peptides cationiques riches en acides aminés spécifiques tels que la proline, l'arginine, la

phénylalanine ou le tryptophane (iii) peptides cationiques qui contiennent une ou plusieurs cystéine(s) leur permettant de former des ponts disulfures comme les défensines par exemple, (iv) peptides cationiques linéaires présentant une structure  $\alpha$ -hélicoïdale avant leur interaction avec la membrane et adoptant ensuite une structure secondaire, (254), (255). Le mode d'action de ces peptides repose principalement sur des dommages causés à la membrane par formation de pores et par interaction directe avec les phospholipides (256), mais ils peuvent également agir sur l'inhibition de la synthèse des macromolécules (acides nucléiques et protéines) (257). Malgré leur potentiel antigénique (258) le risque de développer des résistances aux peptides antimicrobiens est faible (259), (260) cette nouvelle classe de molécules constitue une alternative prometteuse aux ATBs classiques. D'ailleurs, certains peptides antimicrobiens sont déjà commercialisés depuis quelques années telles que la bacitracine, la colistine ou encore la polymyxine B, (261), (248).

## 2. Thérapie phagique

« *L'ennemi de mon ennemi est mon ami* », l'adage est parfait pour décrire les bactériophages qui sont des virus infectant spécifiquement les bactéries. Cette infection implique une reconnaissance spécifique *via* des récepteurs présents uniquement à la surface de la membrane bactérienne les empêchant ainsi d'infecter les cellules eucaryotes (263). D'ailleurs ils sont le plus souvent spécifiques d'une seule espèce bactérienne. Les bactériophages, sont classifiés en fonction de leur mode de reproduction, ils peuvent être lytiques ou lysogéniques (263). Dans le premier cas la réplication du phage va entraîner la lyse de la cellule dans laquelle il s'est répliqué, ce sont les plus virulents ; dans le cas de la lysogénie, le phage va intégrer son matériel génétique dans l'ADN de la bactérie et sera ainsi transmis à la descendance. Cependant une induction peut faire entrer le phage en phase lytique. Tous les phages ne sont pas adaptés à la thérapie, en effet les phages lytiques sont préférentiellement utilisés car ils conduisent rapidement à la destruction de la cellule bactérienne et les chances de recombinaisons avec le génome bactérien sont faibles (250). Différentes études ont permis de démontrer l'efficacité des phages dans le traitement d'infections de bactéries, aussi bien Gram positives (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*) que Gram négatives (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *A.baumannii*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*) (265). La thérapie phagique présente plusieurs avantages (263) :

- Les phages présentent une forte spécificité pour la bactérie cible,
- Une seule inoculation est nécessaire car le phage se réplique tant qu'il y a des bactéries,
- Les récepteurs présents à la surface de la bactérie sont principalement des facteurs de virulence, de ce fait, dans le cas où une mutation entraîne une altération ou une perte de ces récepteurs la bactérie est moins virulente (266),
- Les bactériophages étant spécifiques des cellules bactériennes, leur utilisation n'engendrera pas de problème de cytotoxicité envers les cellules eucaryotes et n'affectera pas la flore commensale de l'homme à l'inverse des ATBs,
- La thérapie phagique est bon marché comparée à un traitement ATB (267).

Néanmoins, comme toutes les thérapies, l'utilisation de phages possède également ses limites. En effet, compte-tenu du peu d'études menées nous ignorons si le comportement des phages *in vitro* sera le même *in vivo*, notamment s'ils persisteront à être lytiques (263). D'autre part, les bactériophages peuvent coder des toxines qui seraient libérées en cas de lyse des bactéries par les macrophages ce qui pourrait être toxique pour le patient (263). L'organisme peut également atténuer l'action des phages par sécrétion d'anticorps dirigés contre les phages. Enfin, à l'image des ATBs, les bactéries peuvent développer des résistances contre les phages par, (i) modification de ses récepteurs, (ii) intégration du génome du phage dans son propre génome ce qui la rendrait insensible aux phages lytiques et (iii), délétion d'un gène nécessaire à la répllication du phage ou à son assemblage (268). Pour tenter de contourner certains inconvénients, une étude a montré qu'une synergie entre phages et ATBs peut être envisagée afin d'augmenter la virulence des phages avec des concentrations sub-inhibitrices d'ATBs (269). Une autre possibilité est d'utiliser uniquement des composants du phage comme la virolysine, qui est une enzyme libérée par le phage pendant son cycle lytique mais qui est efficace uniquement sur les BGP (263).

### **3. Utilisation de probiotiques**

Les probiotiques sont des micro-organismes qui sont consommés vivants et qui exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Leur utilisation est généralement prophylactique, et permet d'aider à maintenir ou à restaurer la flore commensale (270).



L'utilisation la plus courante est celle de la consommation « d'ultra-levure<sup>®</sup> » prescrite pendant un traitement ATB afin de limiter les dégâts sur la flore intestinale. Certaines bactéries dites probiotiques synthétisent des peptides appelés bactériocines ayant des propriétés antimicrobiennes. Ces bactériocines constituent une véritable stratégie de défense puisqu'elles permettent à la bactérie qui les sécrète d'en éliminer d'autres qui sont présentes dans le milieu, ce qui augmente la disponibilité en nutriments et donc optimise sa croissance (271). Une étude menée par Dabour et *al* en 2009 a mis en évidence que l'utilisation de bactériocines pouvait se révéler plus efficace une fois l'infection établie, ce qui démontre pour la première fois le potentiel thérapeutique de ces molécules. Cela a été démontré par l'administration de la pédiocine PA-1 et de *Pedococcus acidilactici* qui est la bactérie qui synthétise PA-1, chez des souris infectées par *Listeria monocytogenes* (272). Depuis d'autres exemples d'administration de bactéries probiotiques ont montré qu'il était possible de les utiliser dans le traitement d'infections bactériennes de l'intestin, de la muqueuse vaginale, ou encore dans la prévention des caries (271). Cependant, comme attendu, des résistances sont été décrites se traduisant notamment par une diminution de la fluidité membranaire réduisant ainsi l'insertion des bactériocines dans la membrane ou alors, par la neutralisation des charges présentes à la surface ce qui rend les bactéries insensibles aux peptides antimicrobiens cationiques (273), (274).

#### **4. Combiner les molécules entre elles**

Face à l'augmentation croissante des résistances, les thérapies combinatoires constituent une stratégie pour pallier le problème d'antibiorésistance et compenser le faible renouvellement de molécules (275), (276). D'autre part, la combinaison de molécules peut permettre de retarder l'apparition de résistance (275), (277) et d'autre part, augmente les chances de parvenir à traiter de manière efficace une infection impliquant des bactéries multirésistantes (275).

##### **4.1 Combinaison ATB-ATB**

Une des approches possibles pour traiter les infections multirésistantes est de combiner deux ou plusieurs ATBs. Bien que des interactions antagonistes soient

possibles, les thérapies combinatoires représentent une stratégie pertinente et efficace dans de nombreuses pathologies. En effet il est courant de recourir à l'association de plusieurs molécules lors de traitement pour le cancer (278) ou encore pour traiter les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (279).

Classiquement on distingue trois types d'approches de thérapies combinatoires en fonction de la cible (280) pour les infections bactériennes:

- **Cibles dans différentes voies** : le traitement de *Mycobacterium tuberculosis* qui est l'agent de la tuberculose nécessite souvent l'association d'ATBs ciblant plusieurs voies tels que la rifampicine liant l'ARN polymérase, associée à d'autres ATBs comme l'isoniazide qui inhibe le cytochrome P450.
- **Cibles différentes dans une même voie**, c'est le cas de l'association de sulfamides et du triméthoprime décrit dans *la section II. §3.4*. En général ce choix concerne des fonctions essentielles pour la bactérie.
- **Cible identique mais avec de multiples mécanismes** comme l'administration de cocktail de synergistines.

#### 4.2 Combinaison ATB-Adjuvant

Comme nous avons pu le voir précédemment, le développement de nouvelles molécules ATBs n'est pas aussi rapide que l'émergence des résistances. En témoignent l'absence de nouvelle classe d'ATB à large spectre et le peu de molécules à spectre étroit commercialisées ces quarante dernières années (281). Ce constat reflète en partie le nombre limité de nouvelles cibles potentielles mais également la difficulté à identifier des molécules non cytotoxiques. D'autre part, la prescription de nouvelles molécules est très contrôlée afin de retarder au maximum l'apparition de résistances ce qui rend le marché de l'ATB peu attractif pour les industries pharmaceutiques qui investissent moins dans secteur de la recherche et du développement d'agents antibactériens (282).

Afin de pouvoir continuer à faire face aux infections, une stratégie alternative consiste au développement de molécules appelées adjuvants capables d'augmenter l'efficacité d'ATBs lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec ces derniers. Généralement ils ne possèdent pas d'activité antibactérienne intrinsèque mais permettent à l'ATB d'avoir une meilleure action sur sa cible. On distingue deux types

d'adjuvants, les adjuvants qui ont pour cible la virulence et les adjuvants qui ont pour cible la résistance bactérienne.

#### **4.2.1 Adjuvants anti-virulence**

##### ***4.2.1.1 Les inhibiteurs du Quorum Sensing***

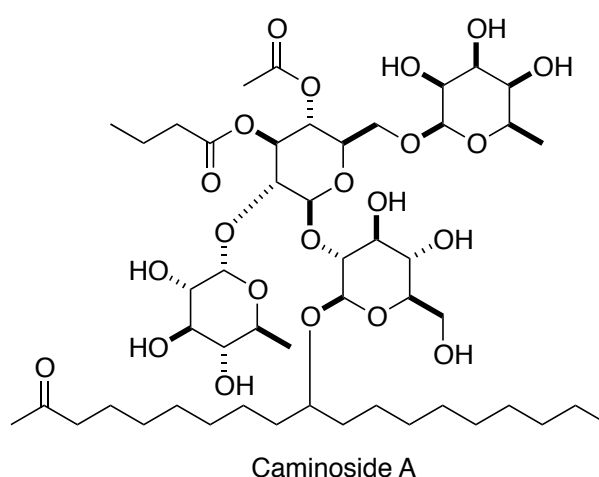
Le Quorum Sensing (QS) est un système de signalisation qui permet à une population bactérienne de coordonner l'ensemble des phénotypes tels que l'expression des gènes de virulence, la résistance aux ATBs et la formation des biofilms, en fonction de la densité cellulaire. Le QS joue donc un rôle majeur dans l'établissement d'une infection, c'est pour cela que le développement d'inhibiteurs peut constituer une alternative aux ATBs (283), (284). Classiquement, trois approches sont envisagées : (i) la perturbation de l'auto-inducteur, (ii) l'inhibition des interactions ligand/récepteur, (iii) la destruction de l'auto-inducteur par clivage enzymatique (283). Une combinaison de ces trois approches peut également être développée afin d'abolir totalement la communication intercellulaire (285).

Plusieurs molécules ont pu être testées en modèle animal, un candidat prometteur a été identifié, l'inhibiteur FS3 a montré une bonne efficacité lorsqu'il est utilisé en synergie avec la daptomycine dans un modèle infectieux de rats (286). La possibilité de retrouver des phénotypes résistants lorsque le QS est inhibé a été mise en évidence, néanmoins Gerdt et Blackwell ont démontré que les phénotypes résistants ne présentaient pas d'avantage par rapport aux sensibles et que leur dissémination serait compromise (287), ce qui encourage le développement de telles molécules.

##### ***4.2.1.2 Les inhibiteurs du système de sécrétion de type III (SST3)***

Le SST3 est une machinerie d'exportation de protéines de type seringue injectant des protéines effectrices, qui sont des facteurs de virulence, directement dans le cytoplasme de la cellule hôte eucaryote (288). C'est donc un des acteurs majeurs de la virulence bactérienne, il n'a d'ailleurs jamais été identifié chez des bactéries non-virulentes (289). Sa structure est conservée à travers 25 espèces bactériennes et peut donc constituer une cible potentielle pour le développement de futures ATBs. Les

bactéries avec des SST3 non fonctionnels sont incapables de fournir des effecteurs et leur virulence est nettement diminuée. Des études menées *in vivo* chez la souris ont d'ailleurs mis en évidence que des mutations affectant le SST3 de *Yersinia pestis* la rendait avirulente même si la bactérie était directement injectée (290). Ces dernières années, la recherche a permis d'identifier une dizaine d'inhibiteurs du SST3 à partir de criblages à haut débit pour la plupart, mais également à partir de synthèses chimiques rationnelles et à partir de sources naturelles (291). Le premier inhibiteur spécifique fut identifié en 2002 par Linington et *al*, la caminoside A (Cf. Figure 12) qui fut isolée à partir d'extraits d'éponge marine *Caminius sphaeroconia* et n'altérerait pas la croissance bactérienne (292).



**Figure 14 :** Structure chimique de la caminoside A

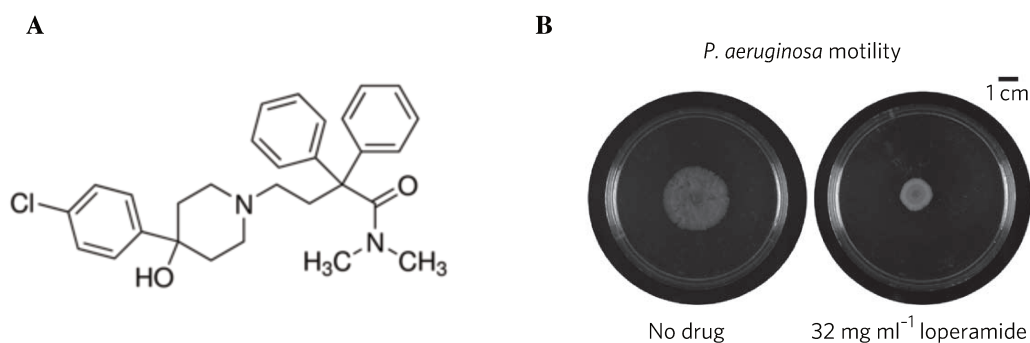
Afin de pouvoir recevoir une AMM, les inhibiteurs du SST3 doivent être plus efficaces que les traitements proposés sur le marché. Bien que de nombreux inhibiteurs se révèlent prometteurs dans les modèles *in vitro*, le manque de preuves d'efficacité *in vivo* empêche pour l'instant leur développement pour une utilisation en clinique (291).

#### 4.2.1.3 Les inhibiteurs de la mobilité bactérienne

La mobilité bactérienne permet à la bactérie de coloniser les surfaces de nombreux environnements. La mobilité est, de plus, étroitement liée au chimiotactisme puisqu'elle permet à la bactérie de se déplacer le long des gradients chimiques de molécules afin de

capter les éléments nutritifs essentiels à sa croissance et de se maintenir dans une niche écologique favorable à la colonisation (293). Il existe plusieurs types de mobilité en fonction de la surface sur laquelle se trouve la bactérie impliquant différents appendices cellulaires. Communément, les pili de type IV sont impliqués dans la mobilité dite « twitching » et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (294), alors que le flagelle fonctionnant avec un rotor mis en mouvement grâce à la FPM, est responsable des mobilités de type « swarming » et « swimming » (293). Nous nous focaliserons sur la mobilité flagelle dépendante car elle constitue un des éléments de la virulence bactérienne, elle est également responsable de l'évasion du système immunitaire de l'hôte (295) et, est largement impliquée dans la formation des biofilms notamment pendant la phase initiale d'attachement (296). La mobilité bactérienne et particulièrement le système flagellaire bactérien, représente donc une nouvelle cible potentielle pour le développement d'inhibiteurs. Ce type d'inhibiteur pourrait constituer une nouvelle classe d'antimicrobiens à part entière ou encore être utilisé en combinaison avec des ATBs existants en tant qu'adjuvant, afin de limiter le développement des infections et la colonisation d'organes cibles dans l'hôte (297).

Une étude a développé une méthode de criblage à haut débit afin d'identifier des inhibiteurs de la mobilité bactérienne (flagelle dépendante et pili de type IV dépendante confondues) (297) mais à ce jour aucune molécule n'a été identifiée comme inhibiteur spécifique de la mobilité. Néanmoins, une autre étude menée par Ejim et *al* visant à identifier des adjuvants de la minocycline a mis en évidence une synergie entre l'ATB et le lopéramide (plus connu sous le nom commercial d'Imodium®) utilisé comme anti-diarrhéique (298). Le lopéramide synergise la minocycline par une altération de la membrane ce qui augmente la concentration intracellulaire d'ATB. Cette action membranotrope provoque une dissipation de la FPM ce qui a également pour conséquence d'inhiber la mobilité flagelle dépendante de *P. aeruginosa* (Cf. Figure 13). Notons cependant que les concentrations de lopéramide utilisées pour inhiber la mobilité sont nettement supérieures à celles utilisées pour synergiser l'ATB.



**Figure 15 :** A. Structure du lopéramide. B. Inhibition de la mobilité de type swarming de *P. aeruginosa* par 32 mg/ml de lopéramide d'après Ejim *et al* (299).

Bien que le développement d'inhibiteurs de la mobilité bactérienne constitue une stratégie intéressante, actuellement peu de recherches ont abouti à l'identification de molécules ce qui laisse le champ libre à de futures découvertes. L'étude menée par Ejim a permis de mettre en évidence qu'un composé agissant de manière non spécifique sur la flagelle pouvait néanmoins être utilisé comme inhibiteur de la mobilité s'il avait une action sur la composante membranaire et/ou énergétique.

#### 4.2.2 Adjuvants anti-résistance

##### 4.2.2.1 Les inhibiteurs de $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactames représentent la classe d'ATBs la plus couramment utilisée en médecine humaine mais une résistance enzymatique est à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques. En effet, les  $\beta$ -lactamases périplasmiques sont capables d'hydrolyser un grand nombre de  $\beta$ -lactames y compris les carbapénèmes. Le développement d'inhibiteurs tels que l'acide clavulanique associé aux pénicillines ou encore le tazobactam associé à la piperacilline a permis de sauvegarder en partie leur activité.

##### 4.2.2.2 Les inhibiteurs d'efflux

Les pompes d'efflux sont responsables du rejet de molécules toxiques, dont font partie les ATBs, à l'extérieur de la cellule bactérienne. Leur surexpression est à l'origine

de l'émergence des phénotypes de multirésistance notamment chez les Entérobactéries et chez *P. aeruginosa*. Elles contribuent également à la résistance intrinsèque des BGN lorsqu'elles ne sont pas surproduites. Les pompes d'efflux sont capables de prendre en charge divers substrats et leur inhibition pourrait ainsi rétablir la sensibilité des bactéries à des ATBs appartenant à différentes classes chez les BGP et les BGN (300), (301). Les pompes d'efflux constituent donc une cible thérapeutique intéressante (302) et leur inhibition permettrait de conserver l'arsenal thérapeutique déjà existant (303), (304), (305). D'autre part, le développement d'inhibiteurs d'efflux permettrait de (i) diminuer la résistance intrinsèque des bactéries vis-à-vis de certaines classes d'ATBs, (ii) de contrer une résistance acquise mettant en jeu la surexpression des pompes d'efflux et (iii) de réduire la fréquence d'émergence de souches résistantes (306). En effet, une étude de Singh *et al*, a démontré le rôle central de la surexpression des pompes d'efflux dans l'acquisition de mutations conférant une résistance accrue aux quinolones chez des isolats d'*E.coli* (307).

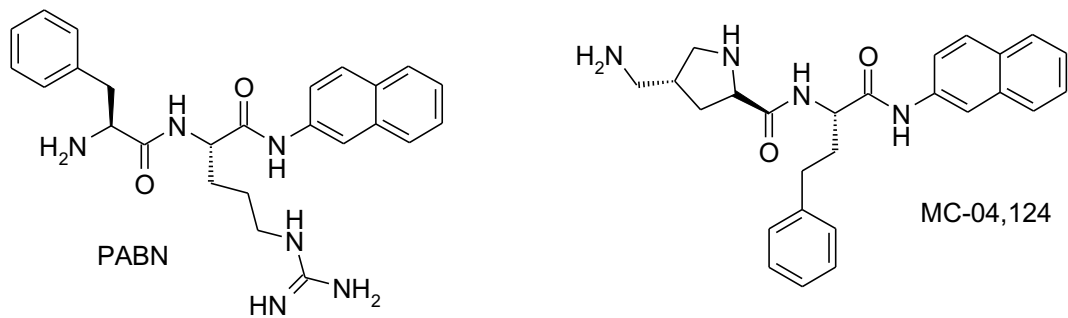
Les inhibiteurs d'efflux peuvent agir selon trois mécanismes : (300), (308), (303) :

- **Inhibition non compétitive** provoquée par des liaisons poly-sélectives au niveau de certains sites de liaison provoquant un encombrement stérique dans la cavité de la pompe,
- **Inhibition compétitive**, l'inhibiteur est un meilleur substrat, souvent un analogue structural qui sera efflué préférentiellement à l'ATB lui laissant le temps d'exercer son action toxique au niveau de sa cible,
- **Dissipation de la source d'énergie** de la pompe comme le *CCCP* (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) qui découple l'énergie de la pompe en collapsant la FPM (303) ce qui va bloquer les changements conformationnels.

Des molécules ont été identifiées comme présentant une activité inhibitrice des pompes d'efflux :

Le *PAβN* (phenylalanine arginyl β-naphthylamide, MC-207,110) appartient aux peptidomimétiques et a été le premier inhibiteur d'efflux identifié chez une BGN (Cf. Figure 14). Il a été caractérisé comme inhibiteur des pompes d'efflux de type RND chez *P. aeruginosa* (309). Il agit à la fois sur la résistance intrinsèque de la souche sauvage, mais également sur des mutants surproducteurs des pompes d'efflux. Il permet de

restaurer l'activité des fluoroquinolones, du chloramphénicol, des macrolides et de la rifampicine (305) notamment chez les Entérobactéries. Afin d'améliorer le profil thérapeutique et pharmacodynamique du PABN, des dérivés ont été synthétisés parmi lesquels la molécule MC-04,124 qui est à la fois moins toxique et plus stable que son prédécesseur (310).



**Figure 16 :** Structure du PABN et de son dérivé MC-04, 124 (310)

Des dérivés *arylpiperazine* et (*naphthy-méthyl*) -*piperazine* (plus connu sous l'acronyme *NMP*) sont des molécules dihalogénées qui initialement avaient démontré une activité de potentialisation du linézolide chez *E. coli* (311). Depuis il a été montré que ces molécules sont capables de restaurer la sensibilité d'isolats multirésistants surexprimant les pompes d'efflux (302). Le NMP permet d'augmenter la sensibilité de souches d'*E. coli* surexprimant les pompes d'efflux AcrAB et AcrEF à divers ATBs tels que les fluoroquinolones, l'érythromycine, le linézolide et le chloramphénicol (312). A l'inverse du PABN qui possède aussi des propriétés de perméabilisation de la membrane externe (313), ces molécules potentialisent l'action de divers ATBs tels que le chloramphénicol, les quinolones ou encore les macrolides sans affecter l'intégrité de la membrane (302). Une des principales raisons pour laquelle tous ces inhibiteurs ne peuvent être utilisés en clinique est la concentration plasmatique élevée nécessaire pour obtenir une inhibition de l'efflux *in vivo* (301).

Les dérivés d'*hydantoïne* permettent de potentialiser l'activité du chloramphénicol et des quinolones chez *E. aerogenes* en modulant l'activité de la pompe d'efflux AcrAB-TolC (314), (315).



Les **quinolines** sont des molécules qui présentent des analogies structurales avec les quinolones. Ces molécules synergisent des ATBs substrats de l'efflux comme bien évidemment les quinolones, mais aussi le chloramphénicol et les cyclines chez *E. aerogenes* également chez *K. pneumoniae*. Les quinolines sont considérées comme des **inhibiteurs compétitifs** d'AcrB. Néanmoins, on note une potentialisation plus faible de la pompe MexB qui est l'homologue d'AcrB par rapport au PABN qui est l'inhibiteur d'efflux de référence chez *P.aeruginosa* (316). Par ailleurs, la résistance naturelle importante de *P.aeruginosa* lui confère une résistance plus élevée à différentes classes d'ATBs et la potentialisation des ATBs par les quinazolines nécessite des concentrations plus importantes que chez les Entérobactéries (317).

Les **phénothiazines** sont des molécules hétérocycliques initialement utilisées comme antipsychotiques et antihistaminiques, elles ont montré une inhibition de l'efflux chez *S. aureus*. Leur utilisation en combinaison avec des substrats de la pompe MFS NorA permet des interactions synergiques et additives. L'étude de leur mode d'action a permis de mettre en évidence qu'elles réduisent fortement le potentiel transmembranaire. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'inhibition de l'efflux puisse se faire en partie par une altération de la FPM (318). D'autre part il a été montré que les phénothiazines augmentent la sensibilité aux ATBs de *Burkholderia pseudomallei*, qui est un pathogène présentant une importante résistance intrinsèque due à la production constitutive de pompes d'efflux de type RND (319).

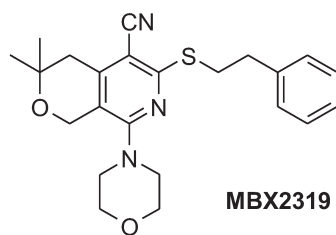
Une grande partie des médicaments utilisés pour traiter les maladies infectieuses provient de sources naturelles. A partir de ce constat, il a été spéculé que les plantes puissent constituer une réserve de molécules capables d'agir sur la multirésistance en étant associées aux antimicrobiens classiques (320), (321). En effet, à l'image des hommes et des animaux, les plantes sont susceptibles d'être la cible d'infections bactériennes et, pour se défendre elles produisent des substances toxiques pour les micro-organismes pathogènes.

La **réserpine** par exemple, qui est un alcaloïde issu de la racine de *Rauwolfia serpentina* était initialement utilisée comme hypotenseur, puis comme antidépresseur. Plus tard, elle a été caractérisée comme inhibiteur des pompes d'efflux eucaryotes dans

les cellules cancéreuses puis elle s'est avérée potentialiser l'action d'ATBs chez des mutants surproducteurs de pompes d'efflux. En effet, elle constitue un inhibiteur de la pompe NorA de *S. aureus* (322) et de *S. pneumoniae* (323) et permet de restaurer la sensibilité à la norfloxacine.

Une étude basée sur un criblage *in silico* de dérivés phytochimiques a permis d'identifier cinq composés prédits pour lier et inhiber la pompe d'efflux AcrB d'*E. coli* (324). Les résultats obtenus avec les tests biologiques ont permis de corréler ceux obtenus avec la modélisation et ainsi de caractériser comme inhibiteurs d'efflux, la plumbagine issue du plumbago (*Plumbago indica*), la skinonine isolée d'une plante d'Extrême-Orient *Lithospermum erythrorizon*, la quercétine qui est un flavonoïde présent chez de nombreuses plantes et qui agit comme un métabolite secondaire, la magnéférine issue de la mangue (*Mangifera indica*) et enfin, l'acide nordihydroguaiarétique plus connu sous l'acronyme NDGA issu du créosotier qui est un petit arbuste du désert (*Larrea tridentata*). Les **terpènes** comme le **géraniol** et l'eugénol sont également des molécules qui potentialisent l'activité d'ATBs comme les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol, les tétracyclines ou encore l'érythromycine notamment en augmentant la concentration intracellulaire d'ATBs (325), (326).

En 2014, Opperman et *al* ont découvert un nouvel inhibiteur des pompes d'efflux de type RND (327). En effet, le composé **MBX2319** est un dérivé de **pyranopyridine** identifié par criblage à haut débit sur *E. coli* potentialise l'activité de plusieurs ATBs comme les fluoroquinolones, les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol, l'érythromycine et le linézolide chez les Entérobactéries. Une synergie a également été observée avec le céfotaxime chez *P. aeruginosa*, cependant l'addition d'un perméabilisant de la membrane externe, la polymyxine-B-nonapeptide (PMBN), augmente l'activité du composé, reflétant ainsi la problématique de l'imperméabilité membranaire comme un obstacle à son activité (328). Le composé MXB2319 apparait comme étant un inhibiteur spécifique des pompes d'efflux de type RND en modifiant l'affinité des substrats pour la pompe. En effet, aucune activité membranotrope ou de perturbation du gradient de protons n'a été observée. De plus il ne possède pas d'activité antibactérienne intrinsèque.



**Figure 17 :** Structure du composé MBX2319 (328)

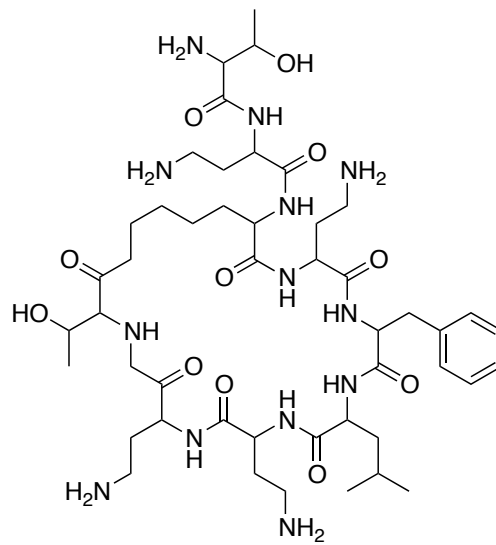
#### 4.2.2.3 Perméabilisants de la membrane externe

Les BGN sont intrinsèquement résistantes à de nombreux ATBs en raison de la membrane externe qui constitue une barrière semi-perméable à de nombreuses molécules comme nous avons pu le voir précédemment. Les petites molécules hydrophiles empruntent la voie des porines pour pénétrer dans la cellule (19), mais le LPS restreint fortement le passage des molécules hydrophobes ou des molécules hydrophiles volumineuses (26).

Il existe des molécules capables d'interagir avec les cations divalents qui stabilisent le LPS rendant ainsi la membrane externe plus perméable aux substances hydrophobes et hydrophiles. Ces molécules sont dites *polycationiques* telles que les polymyxines, les aminosides ou encore certains peptides antimicrobiens déstabilisent localement la membrane ce qui permet leur passage à travers la membrane mais en même temps facilitent l'entrée d'autres molécules alors présentes dans le milieu extracellulaire comme les ATBs, (329), (330), (331). D'autres molécules comme l'EDTA agissent comme chélateur des ions divalents ce qui déstabilisent indirectement la membrane. Combiner des ATBs pour lesquels des bactéries sont naturellement résistantes par imperméabilité, avec des agents perméabilisants de la membrane externe peut constituer une stratégie pertinente (332). Les agents perméabilisants sont en général des molécules cationiques et amphiphiles (330), (329), (331), (332).

Parmi les perméabilisants les plus étudiés, la *PMBN* (Cf. Figure 18) est un dérivé déacétylé de la polymyxine B qui a perdu l'activité ATB mais a conservé les propriétés perméabilisante de la membrane externe. Plusieurs études ont mis en évidence la synergie existante entre la PMBN et certains ATBs tels que la novobiocine, l'acide

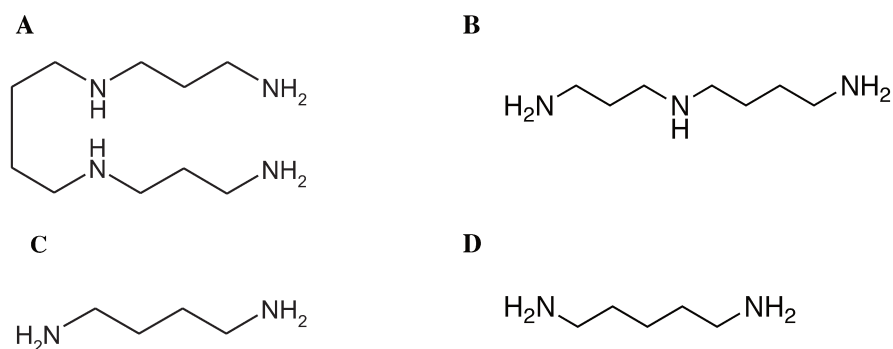
fusique, l'érythromycine (333) ou encore de la daptomycine chez plusieurs espèces de BGN parmi lesquelles *E. coli* et *P. aeruginosa* (334). Ces ATBs ne sont généralement pas utilisés dans le traitement des infections impliquant des BGN car ils ne traversent pas efficacement la membrane externe (332). Cependant la PMBN exerce une néphrotoxicité importante ce qui réduit son utilisation en clinique (20).



PMBN

**Figure 18 :** Structure de la polymyxine B nonapeptide (PMBN)

D'autres molécules comme les polyamines sont connues pour posséder des propriétés membranotropes et ainsi augmenter la perméabilité de la membrane externe des BGN (335), (336). Ainsi des polyamines naturelles comme la cadaverine, la putrescine, la spermidine, et la spermine augmentent la sensibilité de *P. aeruginosa* à différents ATBs tels que les  $\beta$ -lactames, l'acide nalidixique, le triméthoprime et le chloramphénicol (336).



**Figure 19 :** Structure de certaines polyamines. A. Spermine. B. Spermidine. C. Putrescine. D. Cadavérine

Comme nous venons de le voir, de nombreuses pistes sont explorées afin d'améliorer l'arsenal thérapeutique existant pour lutter contre les infections bactériennes. Néanmoins le développement de nouvelles molécules antibactériennes à proprement dites, ou d'adjuvants d'ATBs est long et onéreux. En attendant que certaines de ces alternatives entrent sur le marché il est impératif de proposer des solutions directement applicables.

## 5. Diminuer l'usage et la consommation des ATB en médecine humaine et vétérinaire

La consommation d'ATBs aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire est un facteur clé de la résistance, bien que les relations soient complexes à établir. Néanmoins, une grande étude menée entre le 1<sup>er</sup> janvier 1997 et le 31 décembre 2002 à travers 26 pays d'Europe a permis de calculer la corrélation entre la consommation d'ATBs et la résistance (1). Les variations géographiques de la résistance s'expliquent par les différences de pression de sélection. En effet, les taux de résistance les plus élevés ont été observés dans les pays européens où la consommation d'ATBs est la plus élevée, comme les pays d'Europe de l'est et du sud mais également en Asie. Ces données confirment l'importance de réduire la consommation d'ATB pour prévenir au maximum le phénomène d'antibiorésistance.

Du point de vue de la médecine vétérinaire, comme nous avons pu le voir précédemment, les pratiques de métaphylaxie ou encore l'utilisation d'antimicrobiens comme facteur de croissance, notamment aux Etats-Unis favorise grandement la sélection et le maintien de bactéries résistantes (337). Il faut tout de même rester prudent lorsque l'on évalue les risques de résistance découlant de l'utilisation d'antimicrobiens et tenir compte d'autres facteurs. En effet, ces facteurs incluent les espèces animales considérées, la dose, la durée du traitement et le nombre d'animaux traités ainsi que les pratiques d'élevage. Une analyse multiparamétrique des quantités utilisées est essentielle pour optimiser au maximum les quantités d'ATBs délivrées tout en étant garant de la santé animale.

Cette diminution des quantités d'antimicrobiens ne peut se faire sans la mise en place de législations et de recommandations à l'échelle nationale et internationale. Les autorités sanitaires l'ont bien compris et leurs réponses ont été décrites dans la partie I, section 3.

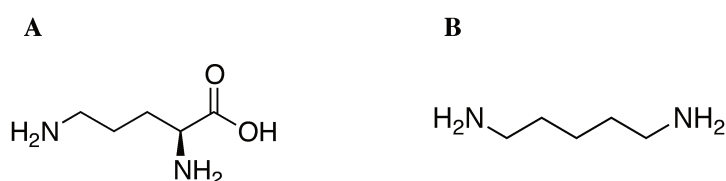
*L'objectif de la thèse* a consisté à associer les deux derniers points décrits, c'est-à-dire *identifier des molécules anti-résistance* qui seront utilisées dans une **thérapie combinatoire** dans le but de *diminuer les quantités d'ATBs utilisées*. Pour cela nous avons choisi de nous focaliser sur des adjuvants polyaminés.

## IV. LES POLYAMINES

### 1. Origine et synthèse des polyamines

Les polyamines sont des petites molécules hydrocarbonées aliphatiques possédant des groupes azotés quaternaires qui ont une charge positive nette à pH physiologique (338). Ces molécules polycationiques sont présentes dans un grand nombre d'organismes vivants et sont impliquées dans de nombreuses réactions biologiques telles que la synthèse d'acides nucléiques (ADN et ARN) mais également dans la synthèse protéique (339) et ont été rapportées comme étant de potentiels régulateurs génétiques (340), (341). Chez *E. coli* des études impliquant des mutants auxotrophes aux polyamines ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel que jouent ces composés dans la croissance de la bactérie (342). En effet, certaines polyamines comme la putrescine, la cadavérine (Cf. Figure 20) et la spermidine sont endogènes et sont produites sous l'action des décarboxylases (339), alors que d'autres comme la spermine sont exogènes mais peuvent être absorbées afin d'être utilisées comme substrat (339).

La concentration intracellulaire en polyamines est régulée par plusieurs paramètres que sont la biosynthèse, la dégradation et le transport. Chez *E. coli* plusieurs gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le transport de ces molécules. Deux transporteurs ABC, PotD qui prend en charge préférentiellement la spermidine et PotF qui assure spécifiquement le transport de putrescine, assurent conjointement l'absorption. Une troisième protéine, PotE, est impliquée à la fois dans l'absorption et l'excrétion de la putrescine. Alors que l'absorption de putrescine est dépendante du potentiel de membrane, l'excrétion est assurée par un antiport putrescine/ ornithine (Cf. Figure 20) dans un ratio 1:1 (343). Par ailleurs, deux autres antiports ont été identifiés chez *E. coli* et assurent le transport d'autres polyamines, l'antiport lysine/cadavérine et l'antiport arginine/agmatine (343).



**Figure 20** : Structure de A. l'ornithine et B. la cadavérine

## 2. Les polyamines : rôle et potentiel thérapeutique

Les polyamines, qu'elles soient synthétiques ou naturelles affectent différentes cibles biologiques ce qui suggère que la recherche sur les polyamines est un domaine prometteur avec un fort potentiel d'identification de nouveaux candidats médicaments.

De nombreuses études ont rapporté l'utilisation des polyamines comme *agents thérapeutiques*. En effet, ces molécules peuvent présenter des propriétés pro- et antiapoptotiques (344), et peuvent également être des modulateurs des récepteurs de neurotransmetteurs (345). D'autre part, les polyamines sont capables d'affecter sévèrement la prolifération cellulaire, ce qui a conduit les chercheurs à considérer leur utilisation dans des traitements de chimiothérapie contre le cancer (346). Les polyamines sont également utilisées comme agents antiparasitaires (347).

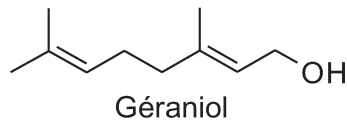
Par ailleurs, les polyamines peuvent également agir comme *modulateurs endogènes de la perméabilité membranaire* chez les BGN (348), induisant même des résistances à certains ATBs comme les quinolones et les aminosides (349). Cette modulation se fait *via* une modification électrophysiologique de l'activité des porines conduisant à une modification de leur perméabilité (313).

Paradoxalement, la *spermine*, la *spermidine*, la *cadavérine* et la *putrescine* sont également capables d'agir comme *perméabilisants* de la membrane favorisant ainsi l'influx de molécules (Cf. partie III. Section 4.2.2.3). En effet, ces molécules potentialisent l'activité de nombreux  $\beta$ -lactames chez *P. aeruginosa* (336). Dans le même contexte, la *naphtylacetylspermine* qui est un analogue synthétique d'un venin d'araignée, et la *méthoctramine* qui est un antagoniste des récepteurs muscariniques, interagissent avec le LPS et déstabilisent sa structure conduisant à une augmentation de la perméabilité membranaire et par conséquent, une augmentation de la sensibilité vis-à-vis d'ATBs hydrophobes tels que la novobiocine et l'érythromycine (335). Une étude a mis en évidence que le caractère perméabilisant des polyamines est directement proportionnel au nombre de groupes amines et au caractère lipophile de la molécule (351).



En outre, plusieurs études ont décrit un effet anti-biofilm par certaines polyamines comme la norspermine et la norspermidine contre les biofilms de *S. aureus* (352) ou encore de *Bacillus subtilis* (353).

Je vais présenter ci-dessous différents travaux antérieurs à mon travail de thèse pour la plupart et qui démontrent l'activité des polyamines.

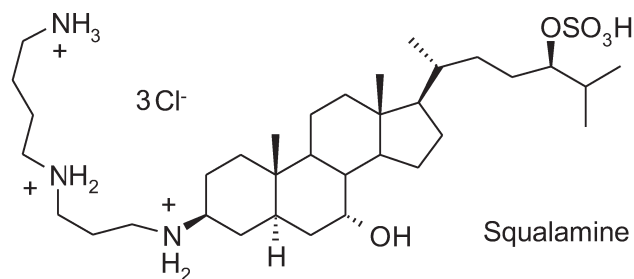


**Figure 21:** Structure du géranol

En 2009, Lorenzi et *al* ont mis en évidence qu'un **alcool diterpénique**, le **géranol** (Cf. Figure 21), issu de l'huile essentielle d'immortelle d'Italie (*Helichrysum italicum*) permettait de potentialiser les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol et les quinolones chez

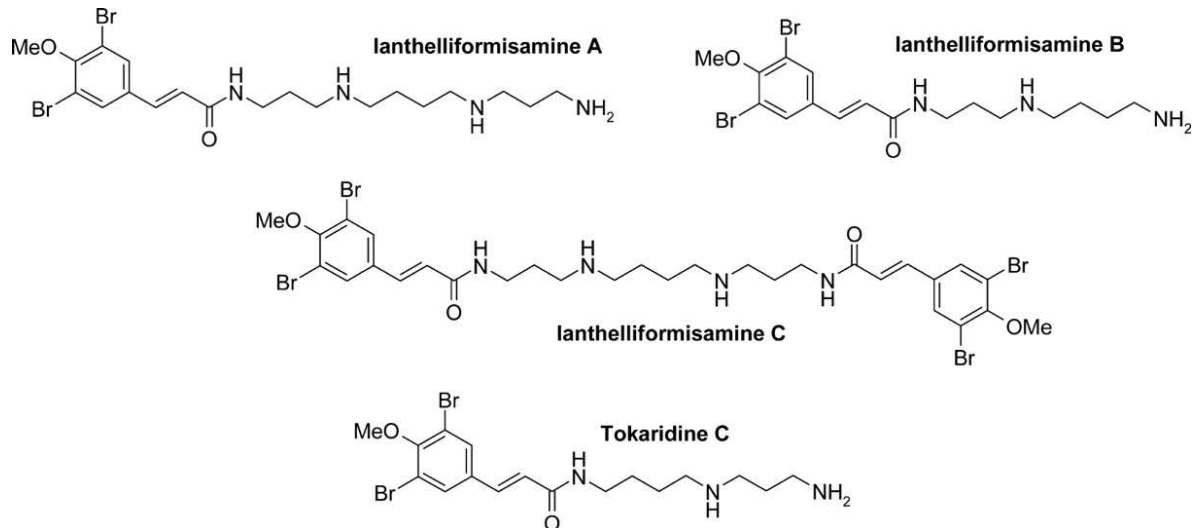
diverses BGN. Plus tard, des dérivés polyaminés du géranol ont été synthétisés, et ces expériences ont permis de mettre en évidence que ces composés bloquent l'activité de la pompe d'efflux AcrAB-TolC chez *E. aerogenes* (354).

L'environnement marin est également une niche écologique renfermant des polyamines présentant certaines propriétés et pouvant être utilisées comme molécules actives. La **squalamine** (Cf. Figure 22) est un alcaloïde polyaminé isolé d'un requin, l'aiguillat (*Squalus acanthia*) aussi appelé *chien de mer*. Une étude a montré que la squalamine possède une activité antimicrobienne à large spectre (355) par d'importants dommages causés à la membrane. En raison de son action et de son insensibilité aux phénotypes de résistance par efflux, la squalamine reflète le fort potentiel des composés polyaminés comme moyen alternatif de lutte contre l'antibiorésistance.



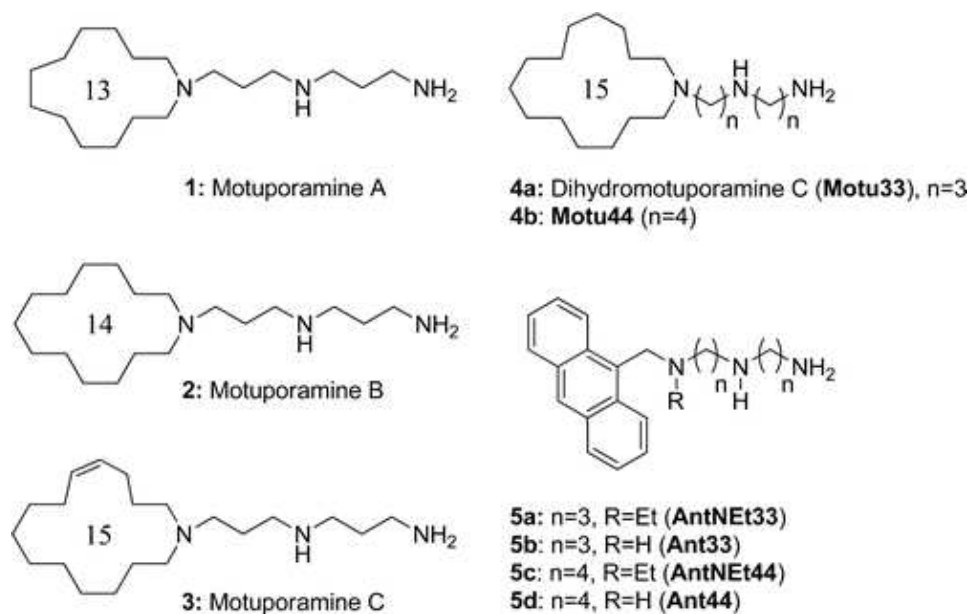
**Figure 22:** Structure de la squalamine (355)

Toujours sous l'océan, les *ianthelliformisamines* (Cf. Figure 23), sont des polyamines isolées de l'éponge marine *Suberea ianthelliformis*, qui ont été identifiées grâce à un criblage haut débit de fractions de produits naturels comme possédant une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* (356).



**Figure 23 :** Structure des ianthelliformisamines naturelles

Leurs voisines, les *motuporamines* sont issues d'une autre éponge marine, *Xestospongia exigua*, et sont constituées d'un large macrocycle et d'un motif norspermidine (Cf. Figure 24). Elles présentent un intérêt biologique important en raison de leurs propriétés anti-invasives et anti-angiogéniques, notamment vis-à-vis des carcinomes mammaires et pancréatiques (357).



**Figure 24** : Structure de quelques dérivés motuporamines (357)

Sur la base de ces observations, nous avons donc considéré *l'utilisation des polyamines comme adjuvant d'ATBs* afin de lutter contre l'antibiorésistance. Le travail de ma thèse a consisté à utiliser des *dérivés de polyamines naturelles* afin de potentialiser l'action des ATBs notamment chez les BGN vis-à-vis desquelles peu de molécules ont montré un potentiel thérapeutique.

## Objectifs et présentation des travaux de thèse

L'*antibiorésistance* est un problème majeur de santé publique qui compromet le traitement efficace d'un nombre croissant d'infections impliquant des bactéries, mais également des actes chirurgicaux ou encore les chimiothérapies contre le cancer. Comme nous venons de le voir, la résistance bactérienne est un mécanisme naturel et inéluctable, néanmoins l'usage abusif et excessif des ATBs en médecine humaine et vétérinaire accélère et accentue fortement le processus d'antibiorésistance. En effet, nous devons faire face aujourd'hui au revers de la médaille que fut l'une des plus grandes avancées de la médecine moderne, la découverte des ATBs. Si nous n'agissons pas aujourd'hui, nous prenons le risque de faire un voyage dans le temps qui nous ramènerait directement dans l'ère pré-ATBs où nous pourrions de nouveau craindre la moindre infection. Afin d'éviter ce scénario catastrophe, de nombreux pays ont mis en place des plans nationaux afin de *sauvegarder l'efficacité des ATBs* en encourageant la recherche, à la fois de nouveaux antimicrobiens mais également le *développement de thérapies alternatives* susceptibles de lutter contre ce fléau.

L'objectif de la société Virbac est de répondre aux recommandations nationales et internationales afin de réduire la *(sur)consommation d'ATBs en médecine vétérinaire* et particulièrement dans les élevages. Cela dans le but de diminuer le rejet de ces molécules dans l'environnement et donc de *limiter l'expansion du phénomène d'antibiorésistance*. Dans ce contexte l'objectif de ma thèse était d'apporter des pistes à l'industriel afin qu'ils puissent envisager de diminuer les quantités d'ATBs dans les élevages de porcs particulièrement impactés par des maladies respiratoires d'origine infectieuses, tout en garantissant la santé des animaux. Pour cela nous avons développé une approche de *thérapie combinatoire* basée sur l'association d'ATBs déjà existants avec des molécules chimio-sensibilisantes, appelées *adjuvants*. En effet, l'enjeu de la thèse était double puisqu'il s'agissait de répondre aux attentes de l'industriel pharmaceutique vétérinaire, c'est-à-dire *diminuer de 25%* les quantités de florfénicol utilisées pour traiter les infections respiratoires chez le porc, tout en proposant une alternative qui était susceptible de supporter les futurs coûts de production.

*Appréhender les aspects économiques futurs du développement des molécules fut initialement déstabilisant à la vue de l'état précoce des recherches, mais cela fait partie intégrante du caractère industriel que revêt une thèse CIFRE ce qui est plus inhabituel dans la recherche fondamentale classique.*

Les études menées au sein de l'UMR-MD1 avant mon arrivée au laboratoire avaient permis de constituer une *chimiothèque* de *dérivés polyamino-isopréniques* qui ont fait l'objet d'un brevet déposé en 2011 (358) (Cf. partie IV). Le but était de cribler cette banque de molécules contre les pathogènes respiratoires du porc afin d'identifier un potentiel adjuvant. Des études préliminaires avaient permis d'identifier au sein de cette banque des molécules capables de diminuer la résistance bactérienne, notamment chez des surproducteurs de pompes d'efflux (325). Cependant, il fallait tout d'abord apporter la *preuve de concept* que *l'association d'ATB avec des dérivés polyamino-isopréniques* puisse permettre de sensibiliser les bactéries de telle sorte que, des quantités d'ATBs plus faibles seraient suffisantes pour inhiber la croissance bactérienne.

D'autre part, il nous a fallu envisager la possibilité que le criblage ne permettrait pas d'identifier des molécules adjuvantes au sein de cette banque de molécules. Nous avons donc, en parallèle, travaillé sur d'autres séries chimiques polyaminées susceptibles de chimiosensibiliser les bactéries. Nous avons conservé comme *fil conducteur* l'utilisation de *dérivés polyaminés d'origine naturelle* afin de focaliser notre étude sur des molécules qui présentent des paramètres physico-chimiques semblables et, ainsi tenter de dégager des relations entre la structure et l'activité des molécules ainsi que leur mode d'action sur les cellules bactériennes.

Afin d'apporter la preuve de concept *in vitro*, nous avons tout d'abord engagé un criblage de la chimiothèque des dérivés polyamino-isopréniques sur le pathogène hautement résistant, *P. aeruginosa*. Pour cette étude nous avons choisi de combiner les molécules à la doxycycline car la bactérie présente une résistance naturelle à cet ATB. Les résultats de ces travaux sont présentés dans l'*article 2*.

En parallèle, j'ai pu tester l'effet de dérivés ianthelliformisamines issus d'une éponge marine et dont la synthèse chimique a été effectuée par Cyril Pieri au sein du

laboratoire de Jean-Michel Brunel. Nous avons évalué l'activité biologique de ces molécules sur des bactéries appartenant au groupe ESKAPE, et nous avons également étudié le mode d'action de ces molécules qui sont décrites dans l'*article 1*.

Les résultats intéressants obtenus avec les dérivés ianthelliformisamines nous ont encouragé à tester d'autres molécules issues d'une éponge marine différente dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Otto Phanstiel de l'université de Floride. En effet, ce dernier avait synthétisé des dérivés motuporamines qui avaient été testées initialement sur des cellules cancéreuses (357). L'*article 3* décrit la potentialisation des ATBs par ces dérivés ainsi que l'élucidation du mode d'action de ces molécules sur différentes bactéries pathogènes qui présentent une relevance en clinique.

Après avoir fourni une *base de résultats solide* démontrant *l'efficacité in vitro d'une thérapie combinatoire* entre des ATBs et des dérivés polyaminés nous avons évalué la potentialisation du florfénicol par les dérivés polyamino-isopréniques sur des pathogènes respiratoires du porc. Cette étude nous a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment sur *P. aeruginosa* mais également d'approfondir le mode d'action de ces dérivés. Ces résultats sont présentés dans l'*article 4*.

Pour finir, nous avons discuté dans une revue (*article 5*), de l'intérêt d'utiliser les polyamines comme moyen de lutter contre la résistance bactérienne en tant qu'agents antimicrobiens ou comme adjuvant d'ATBs.



## Chapitre II. Résultats





## ARTICLE 1 :

### **New Ianthelliformisamine derivatives as antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria.** Cyril Pieri, Diane Borselli, Carole Di

Giorgio, Michel De Méo, Jean-Michel Bolla, Nicolas Vidal, Sébastien Combes, Jean Michel Brunel. *J Med Chem.* **57** (10), pp 4263–4272, (2014).

La présence de la membrane externe chez les BGN confère une résistance accrue à de nombreux ATBs et représente donc une cible potentielle dans le développement de molécules chimiosensibilisantes. Les polysaccharides assurent la stabilité de la membrane externe, ainsi, pour développer une résistance à ce type de molécules les bactéries seraient contraintes de modifier la structure de leur membrane et ce qui pourrait altérer leur fitness. Aussi les polyamines étant des molécules protonnables, elles sont capables d'interagir avec les charges négatives du LPS provoquant ainsi des modifications dans l'homéostasie membranaire.

Nous avons donc considéré l'utilisation de polyamines comme adjuvant afin de potentialiser l'activité d'ATBs hydrophobes. Récemment une étude a décrit les propriétés antibactériennes de métabolites issus d'une éponge marine *Suberea ianthelliformis*. En effet, un criblage à haut débit d'extraits naturels a été réalisé initialement sur une souche mutante, délétée de la pompe d'efflux MexAB-OprM, PA0200 afin de pouvoir sélectionner des hits en éliminant la composante de l'efflux. Les hits identifiés dans ce premier criblage ont ensuite été à nouveau criblés contre la souche sauvage de *P. aeruginosa*, PA01 ainsi que sur une souche résistante à la méthicilline de *S. aureus*, afin d'évaluer la sélectivité vis-à-vis des Gram négatives considérées comme une problématique majeure de santé publique. Ainsi, les ianthelliformisamines A, B, et C ont été reportées comme possédant des activités antibactérienne contre le pathogène hautement résistant *P. aeruginosa* (356).

Sur la base de ces résultats nous avons voulu synthétiser des dérivés des ianthelliformisamines A, B, et C afin d'améliorer l'activité de ces molécules naturelles. Ainsi nous avons décrit le design, la synthèse et l'activité biologique de dérivés des ianthelliformisamines en tant qu'adjuvants d'antibiotiques chez des bactéries à Gram négatives présentant une relevance clinique importante, tels que *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *K. pneumoniae*. Après avoir obtenus des rendements de

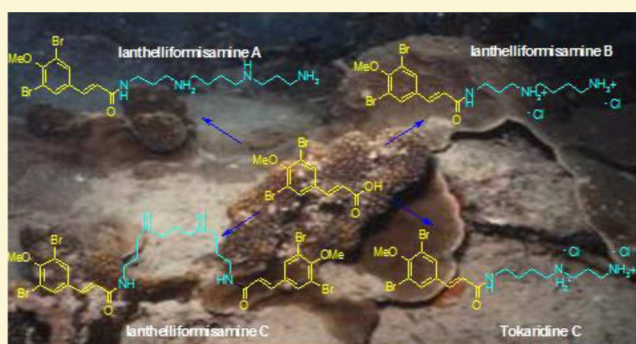
synthèse variants de 27% à 91% et mesuré l'activité microbiologique nous avons également étudié le mécanisme d'action de ces dérivés sur la physiologie bactérienne.

## New Ianthelliformisamine Derivatives as Antibiotic Enhancers against Resistant Gram-Negative Bacteria

Cyril Pieri,<sup>†</sup> Diane Borselli,<sup>‡</sup> Carole Di Giorgio,<sup>§</sup> Michel De Méo,<sup>§</sup> Jean-Michel Bolla,<sup>‡</sup> Nicolas Vidal,<sup>||</sup> Sébastien Combes,<sup>†</sup> and Jean Michel Brunel<sup>\*,†</sup><sup>†</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), CNRS, UMR7258, Institut Paoli Calmettes, Aix-Marseille Université, UM 105, Inserm, U1068, F-13009 Marseille, France<sup>‡</sup>Aix-Marseille Université, IRBA, TMCD2 UMR-MD1, Faculté de Médecine, 13385 Marseille, France<sup>§</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, UMR 7263/IRD 237, 13385 Marseille Cedex 05, France<sup>||</sup>UPCAM iSm2, Case 342, Aix-Marseille Université, Avenue Escadrille Normandie Niémen, 13397 Marseille Cedex 13, France

## Supporting Information

**ABSTRACT:** A series consisting of ianthelliformisamines A, B, and C as well as its synthetic analogues was prepared in high chemical yield, from 27 to 91%, using peptide coupling as the key step, and the compounds were evaluated for their in vitro antibiotic enhancer properties against resistant Gram-negative bacteria and clinical isolates. The mechanism of action of one of these derivatives against *Pseudomonas aeruginosa* when combined with doxycycline was precisely evaluated utilizing bioluminescence to measure ATP efflux and fluorescence to evaluate membrane depolarization.



## 1. INTRODUCTION

Because of their increased use for the treatment of numerous bacterial infections during recent decades, antibiotics represent one of the biggest healthcare blockbusters by decreasing both morbidity and mortality. Nevertheless, this success has led to inappropriate prescribing, thus increasing the number of antibiotic-resistant bacteria. Because of development costs and low profitability, novel antibiotic compounds are lacking in the commercial market.<sup>1</sup> The emergence of Gram-negative multi-drug-resistant (MDR) bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, has prompted efforts to develop new classes of antibiotics to overcome this problem. The global strategy of identifying compounds that can circumvent the MDR phenotype is very promising because one molecule could potentially enhance the activity of numerous antibiotics. Furthermore, the bacterial membrane, which forms an effective barrier to many types of antibiotics,<sup>2</sup> represents an appealing target because it is highly conserved among most strains of Gram-negative bacteria. Thus, resistance to membrane-active antibiotics would require a major change in membrane structure, which would influence the permeability barrier and increase susceptibility to hydrophobic antibiotics. Most responses to Gram-negative bacteria can be attributed to the major components of the outer membrane, namely, lipopolysaccharides (LPS) and their lipid A anchor.<sup>3–8</sup>

The permeability barrier of the outer membrane is due to the cross-bridging between lipid A molecules and calcium or magnesium divalent cations.<sup>3</sup> Thus, cationic peptides<sup>9</sup> and

polyamines,<sup>10</sup> which can weaken the binding sites of divalent cations, can lead to the disruption of the outer membrane organization, increasing its permeability. In this context, the use of compounds targeting the membranes of Gram-negative bacteria and enhancing the sensitivity of bacteria to hydrophobic antibiotics represents an attractive approach for the development of antibacterial agents because they are not expected to promote resistance. The presence of a polyamino moiety is crucial for achieving high antimicrobial activities.<sup>10</sup> We recently reported the synthesis of substituted polyamino geranic acid molecules containing a terpene core and various polyamino groups and investigated their use as potent activators of various common antibiotics against several Gram-negative bacteria strains that exhibit a MDR phenotype.<sup>11</sup> Additionally, in 2012, Xu et al. reported the isolation of ianthelliormisamines A–C, antibacterial bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge, *Suberea ianthelliformis* (Figure 1).<sup>12</sup>

Here, we describe the design, synthesis, and biological activity of new ianthelliformisamine derivatives as antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria. We also analyze the original mechanism of action of this class of derivatives against Gram-negative bacteria.

Received: February 6, 2014

Published: May 6, 2014

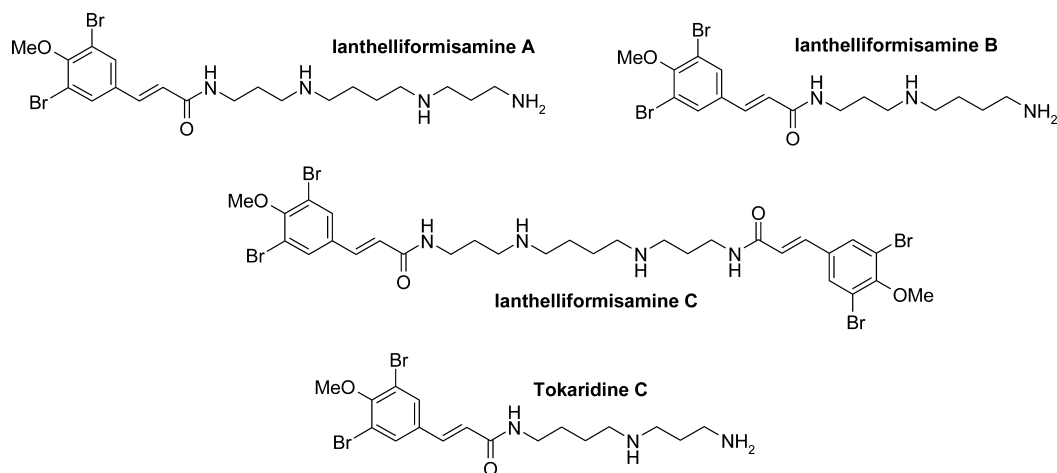
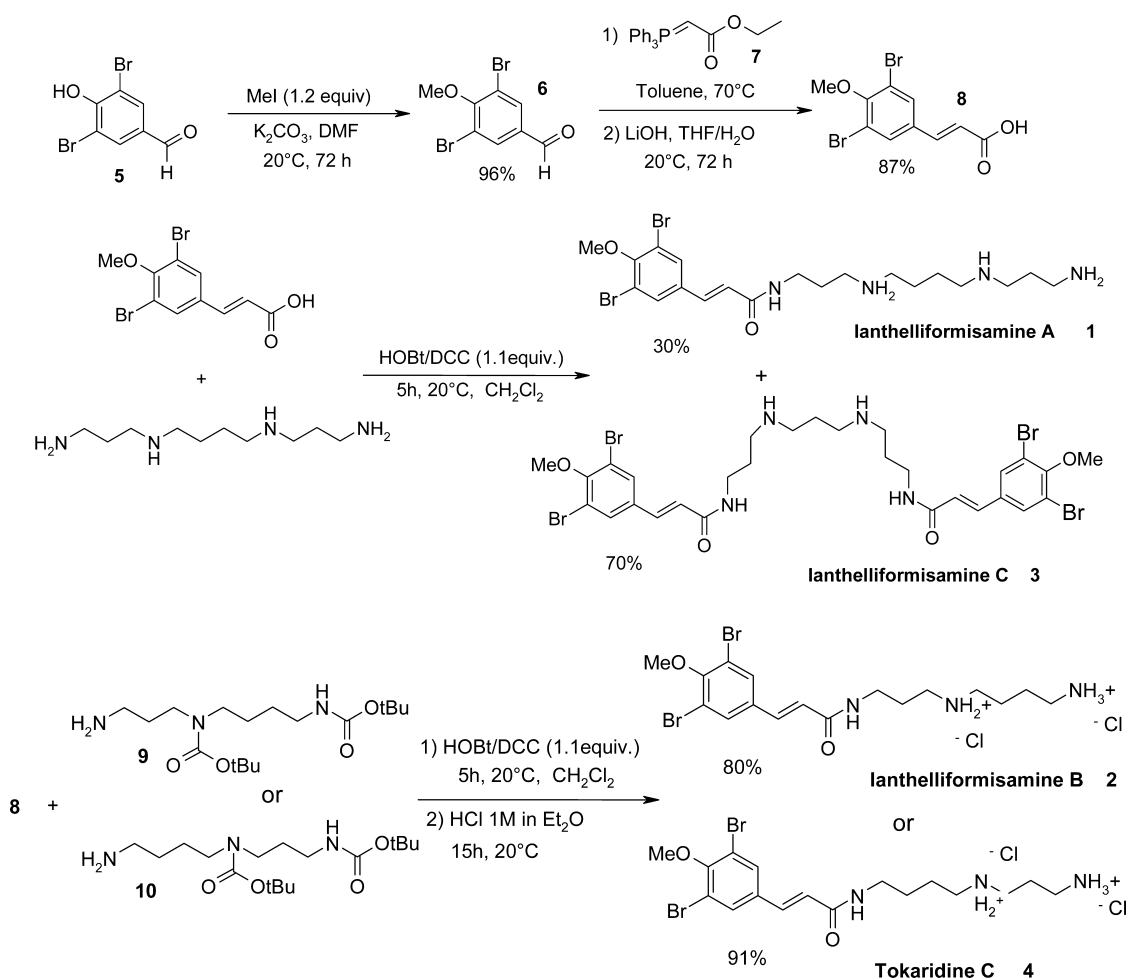


Figure 1. Structure of natural ianthelliformisamine derivatives.

Scheme 1. Synthesis of Ianthelliformisamine A–C and Tokaridine C



## 2. RESULTS AND DISCUSSION

Because of the novel chemical structure of ianthelliformisamines A–C and tokaridine C, we decided to synthesize these natural products (Scheme 1).

The common precursor for these compounds is the use of (E)-3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylic acid, which is easily prepared in a three-step synthesis from 3,5-dibromo-4-hydroxybenzaldehyde (5) in 84% overall yield; this route

involves a Wittig reaction with ethoxymethylidene triphenylphosphorane (7) as the key step. Subsequent coupling involving a dicyclohexylcarbodiimide (DCC)/HOBT reagent afforded ianthelliformisamine A–C (1–3) and tokaridine C (4) in isolated yields varying from 32 to 80%. Notably, all analytical data are in accordance with those previously reported, thus confirming the assigned structures of these isolated marine metabolites. This chemical approach was successfully utilized for the preparation of various non-natural ianthelliformisamine

Table 1. New Ianthelliformisamine Derivatives 11–22

RNH <sub>2</sub>	Product	Yield (%) <sup>a</sup>
1,2-Ethylenediamine		27
1,3-Propanediamine		60
Putrescine		85
Cadaverine		26
N-(3-Aminopropyl) pyrrolidine		64
N-(3-Aminopropyl) morpholine		84
3,3'-Diamino-N-methyl dipropylamine		80
Triethylenetetramine		26
Tetraethylenepentamine		56
1,4-Bis(3-aminopropoxy) butane		29
Tris(3-aminopropyl)amine		51
1,4-Bis(3-aminopropyl) piperazine		36

<sup>a</sup>Isolated yield.

derivatives by varying the structure of the polyamines involved (Table 1).

Adducts 11–22 were obtained in good to excellent yield, varying from 27 to 85%, depending on the nature of the polyamine.

Infections caused by MDR Gram-negative bacteria are increasing worldwide,<sup>13,14</sup> and the emergence of bacteria resistant to all classes of antibiotics (namely, pandrug-resistant (PDR) bacteria) appears as a frightening end point in the development of antimicrobial resistance.<sup>15,16</sup> Despite the small number of strains of such bacteria, there is great concern in the medical community because clinicians have no options for treating patients with PDR bacterial infections. Recently, numerous clinical reports confirmed that Gram-negative bacteria have developed resistance to polymyxins,<sup>17,18</sup> which have become widely used in several countries as the last therapeutic barrier against PDR Gram-negative bacteria.<sup>19</sup> Thus, we investigated the potency of our new class of derivatives against two Gram-negative bacteria, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, that are commonly observed in hospitals.

First, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of molecules 1–4 and 11–22 were evaluated against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains to determine the concentrations to which each strain could be exposed to produce direct antibacterial activity.

As summarized in Table 2, all compounds demonstrated MICs over 200  $\mu\text{M}$  except for the natural derivative,

**Table 2. MIC of Antibiotics and Compounds 1–4 and 11–22 against Various Bacterial Strains**

compound	MIC $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	EA289	SA DSM 799	PAO1	KPC2 ST258
chloramphenicol	>200	ND	>200	ND
cefepime	52 (25)	ND	26 (12.5)	ND
doxycycline	56 (25)	<3	112 (50)	ND
1	>200	>200	200	>200
2	100	>200	>200	>200
3	100	12.5	25	12.5
4	>200	200	200	>200
11	>200	>200	>200	>200
12	>200	>200	100	>200
13	>200	>200	>200	>200
14	>200	>200	>200	>200
15	>200	>200	>200	>200
16	>200	>200	>200	>200
17	>200	>200	200	>200
18	>200	>200	>200	>200
19	200	50	100	>200
20	>200	>200	>200	>200
21	>200	50	100	>200
22	>200	6.25	>200	>200

ianthelliformisamine C (3), which presented MICs varying from 12.5 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  depending on the Gram-positive and Gram-negative bacterial strains.<sup>12</sup>

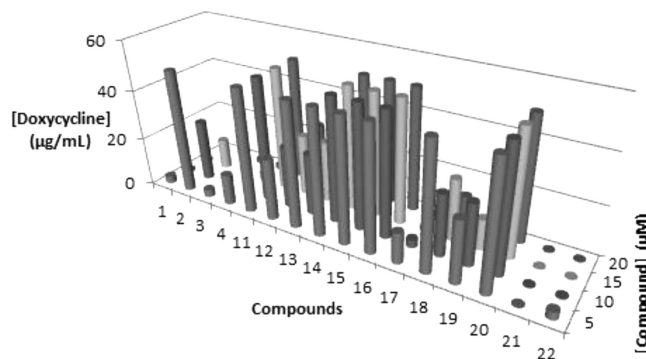
As previously described, the development of a chemosensitizing agent to increase the internal antibiotic concentration in resistant strains is an attractive approach to circumvent bacterial resistance. Thus, we envisioned the use of our ianthelliformisamine derivatives in combination with classic antibiotics to bypass the mechanistic and enzymatic barriers that reduce the intracellular concentrations of active antibacterial drugs. In a

preliminary experiment, doxycycline (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a concentration corresponding to its pharmacokinetic properties in humans<sup>20</sup>) was used to determine the concentrations of our products that could achieve this effect. At this concentration of doxycycline, natural derivatives 2–4 at 3.12–12.5  $\mu\text{M}$  are able to restore the activity of doxycycline against *Enterobacter aerogenes* EA289, *P. aeruginosa* PAO1, and *K. pneumoniae* KPC2 ST258. Moreover, non-natural compounds 17, 19, and 21 were highly efficient in the same range of concentrations (Table 3).

**Table 3. Concentration of Ianthelliformisamine Derivatives 1–4 and 11–22 Necessary To Restore Doxycycline Activity (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against EA289, PAO1, and KPC2 ST258 Gram-Negative Bacterial Strains**

compound	concentration of ianthelliformisamine derivative used ( $\mu\text{M}$ )		
	EA289	PAO1	KPC2 ST258
1	>100	12.5	>100
2	25	12.5	3.12
3	12.5	3.12	12.5
4	6.25	3.12	3.12
11	>100	>100	50
12	>100	100	100
13	>100	>100	>100
14	>100	>100	6.25
15	>100	25	>100
16	>100	>100	>100
17	12.5	6.25	3.12
18	>100	>100	>100
19	12.5	6.25	3.12
20	>100	>100	>100
21	6.25	3.12	3.12
22	>100	>100	>100

We also observed that after the MIC of doxycycline was decreased by treatment with a compound that later it was also particularly active with cefepime. Thus, we identified two groups of compounds, one consisting of derivatives 1, 11–16, 18, 20, and 22, which displayed weak or no activity, and a second group consisting of compounds 2–4, 17, 19, and 21, which increased the antibiotic susceptibility effectively against PAO1. Similar dose-dependent effects were observed for ianthelliformisamine derivatives 1–4 and 11–22 in combination with doxycycline against *P. aeruginosa* PAO1 (Figure 2).



**Figure 2. Dose-dependent effect of ianthelliformisamine derivatives 1–4 and 11–22 in combination with doxycycline against *P. aeruginosa* PAO1.**



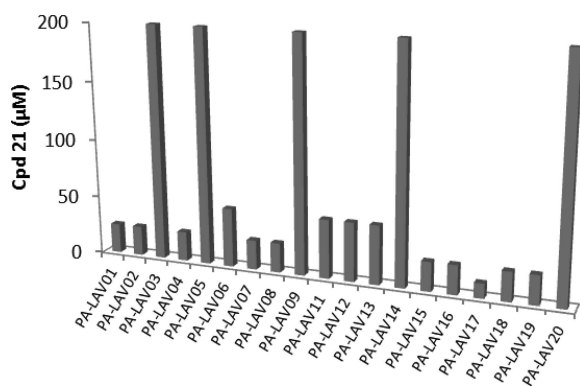
Notably, the chloramphenicol activity was improved in the presence of high concentrations of these derivatives, whereas the effect on cefepime resistance was stronger at lower concentrations of these later (Table 4).

**Table 4. Concentration of the Select Ianthelliformisamine Derivatives Required To Restore Chloramphenicol, Doxycycline, and Cefepime Activity (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against the PAO1 Bacterial Strain and Their Associated Cytotoxicity**

compound	<i>P. aeruginosa</i> PAO1			IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
	CHL <sup>a</sup>	DOX <sup>a</sup>	FEP <sup>a</sup>	CHO	fibroblasts
2	200	12.5	0.8	1665	129
3	12.5	3.12	1.6	663	237
4	100	3.12	3.125	108	33
17	200	6.25	6.25	174	24
19	100	6.25	6.25	573	237
21	100	3.12	0.4	846	345

<sup>a</sup>CHL, chloramphenicol; DOX, doxycycline; FEP, cefepime.

Compound **21** was subsequently applied to restore doxycycline activity against clinical MDR isolates of *P. aeruginosa* (Figure 3). Five strains remained insensitive to



**Figure 3.** Concentration of ianthelliformisamine derivative **21** used to restore doxycycline activity (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against *P. aeruginosa* clinical isolates.

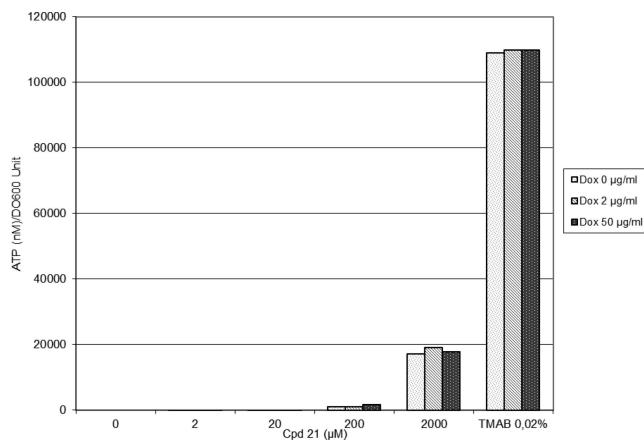
compound **21**, and all of these strains were resistant to gentamycin. Some strains of *P. aeruginosa* exhibit aminoglycoside resistance related to a transport defect or membrane impermeabilization. This mechanism is most probably chromosomally mediated, and it results in cross-reactivity to all aminoglycosides, which could explain the ineffectiveness of compound **21** against these five strains.<sup>21,22</sup> All other strains presented similar antibiograms (data not shown), providing good to moderate results at a concentration of derivative **21** (12.5–50  $\mu\text{M}$ ) necessary to restore doxycycline activity at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Moreover, nondetrimental cytotoxicities against Chinese hamster ovary cells (CHO) and human fibroblasts, with IC<sub>50</sub> values up to 100  $\mu\text{M}$ , were noted for the best derivatives, suggesting their potential therapeutic use for circumventing MDR.

From a mechanistic point of view, even if these compounds exhibit low antibacterial activity, their synergism with different antibiotics against Gram-negative bacteria remains questionable. Thus, two main modes of action are envisioned: (i) permeabilization and/or disruption of the outer membrane of

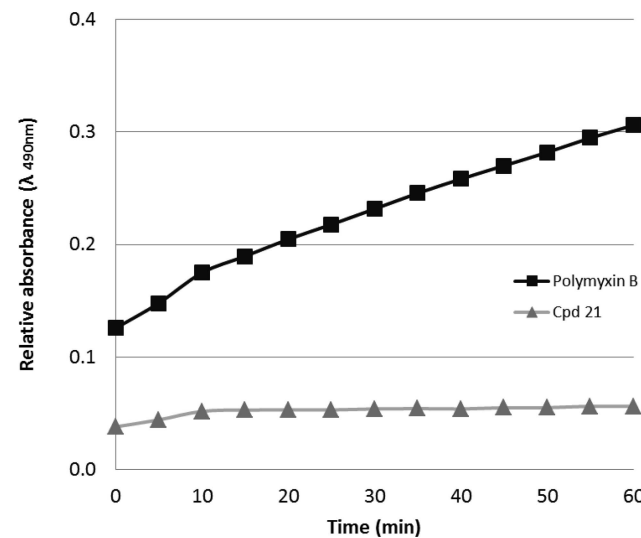
the bacteria and (ii) efflux pump inhibition. Recently, Katsu et al. investigated the structure–activity relationship between the outer membrane of Gram-negative bacteria and original polyamines such as naphthylacetylspermine and methoctramine.<sup>23</sup> These studies demonstrated that the presence of lipophilic moieties as well as a number of amino groups on polyamines was important for permeabilization.<sup>23</sup>

Thus, the effect of **21** on the intracellular pool of bacterial ATP was determined by using a bioluminescence method. Thus, the external concentration of ATP was used as an indicator of the dose-dependent permeabilizing effect of **21**. For *P. aeruginosa*, no ATP release was observed (less than 16% of maximal efflux) using 2 mM compound **21** (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of compound **21** on ATP efflux in *P. aeruginosa* (PAO1) in the presence or absence of doxycycline.

Furthermore, no ATP efflux was observed using a synergistic combination of **21** and doxycycline, even at high concentrations. Thus, the integrity of the outer membrane is not affected. Next, nitrocefin, a chromogenic  $\beta$ -lactam that is efficiently hydrolyzed by periplasmic  $\beta$ -lactamase, was used to measure the cell outer membrane permeabilizing activity.<sup>24,25</sup> As shown in Figure 5, even at a high concentration

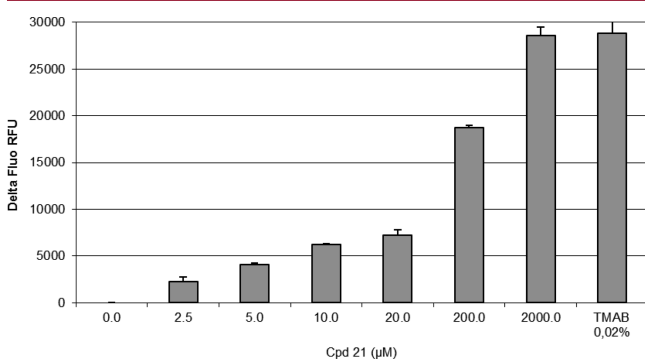


**Figure 5.** Effect of polymyxin B and compound **21** (500  $\mu\text{M}$ ) on nitrocefin hydrolysis in the periplasmic space of *P. aeruginosa* (PAO1).



(500  $\mu\text{M}$ ), the efflux pump inhibitor **21** did not increase the rate of nitrocefin hydrolysis compared to that of the untreated control. Lower concentrations were also tested under the same conditions and resulted in a similar response (see the Supporting Information). In contrast, polymyxin B (PMB) treatment dramatically increased the rate of nitrocefin hydrolysis.

Efflux pumps can expel a wide variety of compounds from bacterial cells, including antibiotics and dyes. In this context, the transport measurement of a dye, known as a substrate, can be used to directly monitor the function of efflux pumps. Treatment with 200  $\mu\text{M}$  **21** resulted in dose-dependent depolarization of the PAO1 membrane, as indicated by a rapid and important increase in relative fluorescence units ( $\Delta\text{RFU}$  values); 60% of the maximal RFU was attained in less than 3 min (Figure 6), indicating disruption of the proton



**Figure 6.** Dose-dependent depolarization of the bacterial membrane of PAO1 in the presence of compound **21**.

gradient. Efflux pumps use energy generated by the proton gradient across the inner membrane for drug extrusion. Taken together, these data indicate that changes in the transmembrane electrical potential in *P. aeruginosa* are not correlated with the permeabilization of cell membranes by ianthelliformisamines, suggesting altered proton homeostasis. Finally, ianthelliformisamines that disrupt the proton gradient may be considered to be efflux pump inhibitors.

### 3. CONCLUSIONS

An original chemical strategy was developed to produce new ianthelliformisamine derivatives in moderate to good yield.<sup>26</sup> Among the synthesized derivatives, compounds **2–4**, **17**, **19**, and **21** dramatically affected the antibiotic susceptibility of *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* MDR strains. This efficiency was correlated with the inhibition of a dye transport, suggesting that these molecules can act on the activity of drug transporters. Studies are now under current investigation to elucidate whether this restoration of antibiotic susceptibility occurs via direct interaction of the molecule with the efflux pump or by deenergization of the efflux pump later. Finally, these derivatives may prove to be useful for studying the importance of efflux in acquired and natural resistance to antibiotics in Gram-negative bacteria.

### 4. EXPERIMENTAL SECTION

**4.1. Materials.** All solvents were purified according to previously reported procedures, and the reagents used are commercially available. Methanol, ethyl acetate, and dichloromethane were purchased from Fisher Scientific and used without further purification. Column chromatography was performed using Merck silica gel (70–230

mesh). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in MeOD using a Bruker AC 300 or AC 400 spectrometer (abbreviations: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet). Tetramethylsilane was used as the internal standard. All chemical shifts are presented in parts per million (ppm). Mass spectroscopy analysis was performed using the Spectropole (Analytical Laboratory) at the University Paul Cézanne (Marseille). The purity of the compounds was verified by analytical HPLC (C18 column, eluent CH<sub>3</sub>CN/water/TFA, 2.3 mL/min) with a PDA detector from 210 to 310 nm. All compounds showed a purity greater than 95%, as determined by analytical HPLC-PDA at 214 and 254 nm.

**4.2. Preparation of Compounds 1–4 and 11–22. Synthesis of 3,5-Dibromo-4-methoxybenzaldehyde 6.** To a stirred suspension of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzaldehyde (5.1 g, 18.2 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in DMF (15 mL) was added iodomethane (1.4 mL, 22.7 mmol), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 72 h. Then, the mixture was diluted with EtOAc (200 mL) and washed with water (2  $\times$  60 mL) and brine (2  $\times$  60 mL). The organic layers were combined and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and the solvents were removed in vacuo to afford pure 3,5-dibromo-4-methoxybenzaldehyde (5.1 g, 96%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  9.86 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 3.97 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  188.33, 159.08, 34.19, 133.87, 119.26, 60.84.

**Synthesis of (E)-Ethyl 3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylate.** A solution of 3,5-dibromo-4-methoxybenzaldehyde (900 mg, 3.1 mmol) and ethoxymethylidetriphenylphosphorane (1.4 g, 4 mmol) in toluene (20 mL) was heated at 70  $^{\circ}\text{C}$  for 15 h. The mixture was evaporated to dryness, and the resulting residue was purified by column chromatography (eluent 100% Et<sub>2</sub>O) to yield pure (E)-ethyl 3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylate (only the (E) isomer was obtained; 1.01 g, 91%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.66 (s, 2H), 7.5 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.26 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  166.1, 155.35, 140.82, 133.09, 131.89, 120.10, 118.63, 60.68, 14.21.

**Synthesis of (E)-3-(3,5-Dibromo-4-methoxyphenyl)acrylic Acid.** To a solution of (E)-ethyl 3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylate (350 mg, 0.97 mmol) in a mixture of THF/H<sub>2</sub>O (7 mL/2 mL) was added LiOH $\cdot$ H<sub>2</sub>O (160 mg, 3.9 mmol), and the solution was stirred at room temperature for 72 h. The mixture was acidified with concentrated HCl (approximately 0.3 mL) until pH 1, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3  $\times$  15 mL). The organic layers were combined, washed with brine (20 mL), and dried (MgSO<sub>4</sub>), and the solvent was removed in vacuo. The pure desired compound was obtained as a white solid (310 mg, 96%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.69 (s, 2H), 7.60 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.37 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

**Synthesis of Ethoxymethylidetriphenylphosphorane 7.** A solution of triphenylphosphine (4.93 g, 18.8 mmol) and ethyl chloroacetate (2 mL, 18.7 mmol) in toluene (40 mL) was stirred at 110  $^{\circ}\text{C}$  for 72 h. The precipitate was filtered and washed with ethyl acetate (2  $\times$  15 mL) to yield 8.8 g of a white solid (pure bromophosphonium salt; 100%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.96–7.65 (m, 15H), 5.66 (d, *J* = 14 Hz, 2H), 4.11 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  164.38, 164.33, 134.86, 133.77, 133.63, 130.07, 129.89, 118.46, 117.28, 62.43, 32.84, 32.10, 20.73, 13.89. <sup>31</sup>P NMR: 20.85. To a solution of the previous bromophosphonium salt (4.2 g, 9.8 mmol) was added 2 M NaOH (200 mL). The mixture was vigorously shaken several times and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2  $\times$  100 mL). The organic layers were combined, washed with water (200 mL) and brine (200 mL), and dried (MgSO<sub>4</sub>), and the solvent removed in vacuo. The desired phosphonium ylide was obtained as a white powder (2.8 g, 82%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.69–7.62 (m, 6H), 7.56–7.42 (m, 9H), 3.96 (m, 2H), 2.88 (s, 1H), 1.06 (m, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  132.98, 132.95, 131.83, 128.69, 128.53, 57.76, 30.87, 29.21, 14.75. <sup>31</sup>P NMR: 17.59.

**Preparation of Ianthelliformisamine A 1 and C 3.** To a solution of (E)-3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylic acid (200 mg, 0.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) were added HOBt (86 mg, 0.66 mmol)

and DCC (135 mg, 0.65 mmol). After stirring at room temperature for 5 h, the precipitate was filtered and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Spermine (135 mg, 0.64 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) was added to the filtrate, and the resulting solution was stirred at room temperature for 15 h. Evaporation of solvents in vacuo afforded an oil that was purified by column chromatography (eluent  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 7:3:1) to afford monoalkylated ianthe'lliformisamine A (1) (100 mg, 30%) and ianthe'lliformisamine C (3) as a side product (180 mg, 70%).

**Ianthe'lliformisamine C 3.**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.67 (s, 4H), 7.28 (d,  $J = 15.8$  Hz, 2H), 6.46 (d,  $J = 15.8$  Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 3.36–3.18 (m, 4H), 2.65–2.49 (m, 8H), 1.7–1.2 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  168.80, 157.11, 139.01, 136.14, 133.83, 124.79, 120.38, 62.10, 50.54, 48.18, 39.08, 35.60, 26.90. MS (ESI)  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4\text{Br}_4$   $m/z$  839.0 (100%,  $(\text{M} + \text{H}^+)$ ), 837.0 (100%,  $(\text{M} - \text{H}^-)$ ).

**Ianthe'lliformisamine A 1.**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  7.83 (s, 2H), 7.42 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.61 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.94–2.78 (m, 12 H), 1.90–1.85 (m, 4H), 1.47–1.70 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  168.96, 157.12, 138.99, 136.23, 133.89, 124.92, 120.37, 62.11, 47.96, 47.55, 40.14, 38.68, 29.21, 28.85, 27.25, 26.87. MS (ESI)  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}_2$   $m/z$  521.1 (100%,  $(\text{M} + \text{H}^+)$ ), 519.1 (100%,  $(\text{M} - \text{H}^-)$ ).

**Preparation of Ianthe'lliformisamine B Hydrochloride Salt 2.** To a solution of (*E*)-3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylic acid (150 mg, 0.45 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) were added HOBt (65 mg, 0.48 mmol) and DCC (100 mg, 0.47 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the white precipitate was filtered, washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL), and {4-[3-amino-propyl]-*tert*-butoxycarbonyl-amino]-butyl}-carbamic acid *tert*-butyl ester (160 mg, 0.46 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) was added to the filtrate. After 3 h, the solution was evaporated to dryness, and the crude residue (240 mg, 80%) was used in the next step.

BOC-protected ianthe'lliformisamine B (50 mg, 0.15 mmol) was dissolved in MeOH (1 mL), and 1 M HCl in  $\text{Et}_2\text{O}$  (1 mL) was added. After stirring at room temperature for 15 h, a white precipitate appeared, and  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL) was added to complete the precipitation of ianthe'lliformisamine B hydrochloride salt 3. This compound was then filtered to yield the desired compound as a white solid (40 mg, 100%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.44 (s, 2H), 7.01 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.25 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.29 (m, 2H), 3.01–2.97 (m, 6H), 1.71–1.63 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  168.10, 153.88, 137.98, 133.24, 131.83, 121.44, 117.74, 60.88, 46.93, 45.16, 38.76, 36.35, 25.64, 23.88, 22.79. MS (ESI)  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}_2$   $m/z$  464.1 (100%,  $(\text{M} + \text{H}^+)$ ), 462.0 (100%,  $(\text{M} - \text{H}^-)$ ).

**Preparation of {4-[3-Amino-propyl]-*tert*-butoxycarbonyl-amino]-butyl}-carbamic acid *tert*-Butyl Ester 9.** **Synthesis of *tert*-Butyl-4-aminobutylcarbamate.** To a 0 °C solution of 1,4-diaminobutane (12 mL, 119.4 mmol) in chloroform (100 mL) was added *tert*-butyl dicarbonate (5 mL, 21.7 mmol) dropwise over 1.5 h. After stirring at room temperature for 15 h, the solvents were removed in vacuo, water was added (150 mL), and the insoluble bis-substituted product was removed by filtration. The filtrate was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  100 mL), and the organic layers were combined, washed with brine (100 mL), and dried over  $\text{MgSO}_4$ ; the solvents were removed in vacuo to afford a pale yellow oil (4.2 g, 100%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  4.72 (s large, 1H), 3.09 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 2.68 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.52–1.4 (m, 13H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  155.81, 41.53, 30.64, 28.15.

**Synthesis of [4-(2-Cyano-ethylamino)-butyl]-carbamic Acid *tert*-Butyl Ester.** To a stirred suspension of *tert*-butyl-4-aminobutylcarbamate (2 g, 10.6 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 g, 36.1 mmol) in acetonitrile (50 mL) was added 3-bromopropionitrile (0.9 mL, 10.8 mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 15 h. The solvents were removed in vacuo, and the crude oil was purified by column chromatography (40 g  $\text{SiO}_2$ , eluent MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 9:1) to yield the desired compound as a colorless oil (820 mg, 32%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  4.81 (s large, 1H), 3.06 (m, 2H), 2.86 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.60 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 2.46 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 1.48–1.38 (m, 13H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  155.88, 118.58, 78.84, 48.55, 44.86, 40.19, 28.27, 27.08, 18.53.

**Synthesis of [4-(*tert*-Butoxycarbonylamino-butyl)-(2-cyano-ethyl)-carbamic Acid *tert*-Butyl Ester.** To a 0 °C solution of [4-(2-cyano-ethylamino)-butyl]-carbamic acid *tert*-butyl ester (750 mg, 3.1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) was added a solution of *tert*-butyl dicarbonate (0.85 mL, 3.7 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) dropwise. After stirring at room temperature for 15 h, the solvents were removed in vacuo, and the crude residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) and washed with 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2  $\times$  30 mL) and brine (30 mL). The organic layer was dried ( $\text{MgSO}_4$ ), and the solvent was removed to afford a colorless oil (1 g, 94%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  4.64 (s large, 1H), 3.41 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.23 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.09–3.07 (m, 2H), 2.57 (s large, 2H), 1.51–1.39 (m, 22 H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  155.91, 146.62, 118.22, 80.37, 78.95, 53.33, 39.88, 28.28, 27.27, 25.78, 25.36.

**Synthesis of {4-[3-Amino-propyl]-*tert*-butoxycarbonyl-amino]-butyl}-carbamic Acid *tert*-Butyl Ester.** A 0 °C solution of (4-*tert*-butoxycarbonylamino-butyl)-(2-cyano-ethyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (1 g, 2.9 mmol) in distilled  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 mL) was carefully added to a suspension of  $\text{LiAlH}_4$  (480 mg, 12.6 mmol) in distilled  $\text{Et}_2\text{O}$  (20 mL). After stirring at 0 °C for 3 h, 5% NaOH (10 mL) was added dropwise, and the white precipitate was removed by filtration and washed with EtOAc (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2  $\times$  20 mL), and the organic layers were combined, washed with brine (2  $\times$  10 mL), and dried ( $\text{MgSO}_4$ ); the solvent was removed in vacuo to afford the desired compound as a colorless oil (760 mg, 75% yield).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  4.73 (s large, 1H), 3.18–3.03 (m, 6H), 2.61 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.44–1.36 (m, 24H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  155.87, 155.55, 79.16, 46.36, 40.02, 28.25, 27.26, 25.51.

**Preparation of Tokaridine C Hydrochloride Salt 4.** To a solution of (*E*)-3-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)acrylic acid (152 mg, 0.45 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) were added HOBt (67 mg, 0.48 mmol) and DCC (102 mg, 0.47 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the white precipitate was removed by filtration and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL). A solution of (4-amino-butyl)-(3-*tert*-butoxycarbonylamino-propyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (158 mg, 0.45 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL) was added to the filtrate. After 3 h, the solution was evaporated to dryness, and the crude residue (275 mg, 91%) was used in the next step.

BOC-protected tokaridine C (100 mg, 0.07 mmol) dissolved in MeOH (1 mL) and 1 M HCl in  $\text{Et}_2\text{O}$  (1 mL) were added. After stirring at room temperature for 15 h, a white precipitate appeared, and  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL) was added to completely precipitate the tokaridine C hydrochloride salt. This suspension was then filtered to yield the desired compound as a white solid (120 mg, 100%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.56 (s, 2H), 7.12 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.35 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.30 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.13–3.06 (m, 6H), 2.10–2.04 (m, 2H), 1.72–1.62 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  167.81, 153.88, 137.46, 133.40, 131.84, 121.82, 117.78, 60.94, 47.38, 44.46, 38.83, 36.57, 25.63, 23.73, 23.08. MS (ESI)  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{Br}_2$   $m/z$  464.0 (100%,  $(\text{M} + \text{H}^+)$ ), 462.3 (100%,  $(\text{M} - \text{H}^-)$ ).

**Preparation of (4-Amino-butyl)-(3-*tert*-butoxycarbonylamino-propyl)-carbamic Acid *tert*-Butyl Ester 10.** **Synthesis of *tert*-Butyl-3-aminopropylcarbamate.** To a 0 °C solution of 1,4-diaminopropane (10 mL, 120 mmol) in chloroform (100 mL) was added *tert*-butyl dicarbonate (5 mL, 21.7 mmol) in chloroform (100 mL) dropwise over 1.5 h. After stirring at room temperature for 15 h, the solvents were removed in vacuo, water was added (150 mL), and the insoluble bis-substituted product was removed by filtration. The filtrate was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (3  $\times$  100 mL), the organic layers were combined, washed with brine (100 mL), and dried ( $\text{MgSO}_4$ ), and the solvents were removed in vacuo to afford the desired product as a pale yellow oil (90% yield (3.4 g)).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD):  $\delta$  4.90 (s large, 1H), 3.20 (q,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.74 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

**Synthesis of [3-(3-Cyano-propylamino)-propyl]-carbamic Acid *tert*-Butyl Ester.** To a stirred suspension of *tert*-butyl-3-aminopropylcarbamate (1.5 g, 8.6 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4 g, 28.9 mmol) in acetonitrile (50 mL) was added 3-bromopropionitrile (0.9 mL, 9



mmol), and the mixture was stirred at 50 °C for 15 h. The solvents were removed in vacuo, and the crude oil (100%) was used without further purification for the next step. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 5.10 (s large, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.72 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.44 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.63 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.42 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ 155.97, 119.61, 47.73, 47.13, 38.76, 29.66, 28.22, 25.54, 14.70.

**Synthesis of (3-[tert-Butoxycarbonyl-(3-cyano-propyl)-amino]-propyl)-carbamic Acid tert-Butyl Ester.** To a 0 °C solution of [3-(3-cyano-propylamino)-propyl]-carbamic acid tert-butyl ester (2.05 g, 8.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) was added tert-butyl dicarbonate (1.9 mL, 8.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) dropwise. After stirring at room temperature for 15 h, the solvents were removed in vacuo, and the crude residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) and washed with 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 × 50 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was removed to afford a colorless oil (2.8 g, 96%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 3.28 (t, J = 7 Hz, 4H), 3.10 (m, 2H), 2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.88 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.69–1.61 (m, 2H), 1.51–1.43 (m, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ 161.15, 155.88, 105.85, 85.06, 80.18, 79.01, 53.34, 52.02, 45.47, 37.41, 30.61, 28.27, 27.29, 22.99, 15.87, 14.74, 14.59.

**Synthesis of (4-Amino-butyl)-(3-tert-butoxycarbonylamino-propyl)-carbamic Acid tert-Butyl Ester.** A 0 °C solution of (4-tert-butoxycarbonylamino-butyl)-(2-cyano-ethyl)-carbamic acid tert-butyl ester (2.8 g, 8.2 mmol) in distilled Et<sub>2</sub>O (50 mL) was carefully added to a suspension of LiAlH<sub>4</sub> (1.3 g, 34.2 mmol) in distilled Et<sub>2</sub>O (50 mL). After stirring at 0 °C for 3 h, 5% NaOH (30 mL) was added dropwise, and the white precipitate was isolated by filtration and washed with EtOAc (20 mL). The aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 50 mL), and the organic layers were combined, washed with brine (2 × 30 mL), and dried over MgSO<sub>4</sub>; the solvent was removed in vacuo to afford the desired compound as a colorless oil (2.2 g, 78%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD): δ 3.25–3.09 (m, 6H), 2.72–2.69 (m, 2H), 2.03 (br s, 2H), 1.68–1.44 (m, 18H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ 155.97, 79.39, 46.75, 43.72, 37.52, 30.86, 25.90, 28.35.

**General Procedure for the Synthesis of Compounds 11–22.** To a solution of **8** (100 mg, 0.3 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) were added HOBt (45 mg, 1.1 equiv) and DCC (70 mg, 1.1 equiv). After stirring at room temperature for 1 h, the white precipitate was removed by filtration, and a solution of amine (1.1 equiv) in dichloromethane (2 mL) was added to the filtrate. The reaction was continued for 5–12 h at room temperature, and the solvents were removed in vacuo to yield a crude residue that was purified by column chromatography.

**(E)-N-(2-Amino-ethyl)-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 11.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 300 MHz): δ 7.82 (s, 2H), 7.43–7.39 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.61–6.57 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.41–3.37 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.83–2.80 (t, J = 7.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 169.03, 157.16, 139.08, 136.23, 133.87, 124.81, 120.39, 62.09, 43.87, 42.79. MS (ESI) C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 379.0 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 376.9 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-(3-Amino-propyl)-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 12.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 300 MHz): δ 7.81 (s, 2H), 7.42–7.38 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.59–6.55 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.40–3.37 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.73–2.70 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.75–1.72 (m, J = 7.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.77, 157.11, 138.96, 136.20, 133.82, 124.77, 120.38, 62.09, 40.54, 38.76, 33.99. MS (ESI) C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 393.0 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 391.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-(4-Amino-butyl)-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 13.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.80 (s, 2H), 7.41–7.37 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.59–6.55 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.36 (m, 2H), 2.71–2.67 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.62–1.55 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.51, 156.99, 138.77, 136.17, 133.76, 124.92, 120.33, 62.09, 42.95, 41.27, 31.77, 28.63. MS (ESI) C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 407.0 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 405.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-(5-Amino-pentyl)-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 14.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.81 (s, 2H), 7.41–7.37 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.60–6.56 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H),

3.35–3.30 (m, 2H), 2.76–2.72 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.63–1.56 (m, 4H), 1.46–1.41 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.61, 156.99, 138.82, 163.17, 133.78, 124.89, 120.32, 62.11, 42.76, 41.34, 32.84, 30.93, 25.99. MS (ESI) C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 421.0 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 419.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-3-(3,5-Dibromo-4-methoxy-phenyl)-N-(3-pyrrolidin-1-yl-propyl)-acrylamide 15.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.81 (s, 2H), 7.42–7.38 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.59–6.55 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.38–3.34 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.61–2.55 (m, 6H), 1.86–1.82 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.55, 157.10, 138.89, 136.22, 133.81, 124.86, 120.37, 62.08, 55.85, 39.82, 30.41, 25.03. MS (ESI) C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 446.9 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 445.2 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-3-(3,5-Dibromo-4-methoxy-phenyl)-N-(3-morpholin-4-yl-propyl)-acrylamide 16.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.69 (s, 2H), 7.30–7.26 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.47–6.43 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.62–3.60 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.27–3.24 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.42 (m, 4H), 2.38–2.34 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.70–1.66 (t, J = 7.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.55, 157.02, 138.87, 136.14, 133.80, 124.85, 120.33, 68.15, 62.09, 58.11, 55.32, 39.57, 27.11. MS (ESI) C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Br<sub>2</sub> m/z 463.1 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 461.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-{3-[(3-Amino-propyl)-methylamino]-propyl}-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-phenyl-acrylamide 17.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.80 (s, 2H), 7.42–7.37 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.59–6.54 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.73–2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.48–2.44 (m, 4H), 2.27 (s, 3H), 1.80–1.66 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.56, 157.05, 138.81, 136.19, 133.75, 124.87, 120.32, 62.06, 57.23, 43.08, 41.70, 39.74, 30.99, 28.57. MS (ESI) C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 464.1 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 462.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-[2-[2-(2-Amino-ethylamino)-ethylamino]-ethyl]-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 18.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.82 (s, 2H), 7.43–7.39 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.62–6.58 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.47 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.85–2.74 (m, 10H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.99, 157.13, 139.07, 136.21, 133.87, 124.84, 120.37, 62.12, 51.97, 42.12, 41.2, 34.86, 27.12, 26.84. MS (ESI) C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 465.1 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 463.0 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-[2-[2-(2-Amino-ethylamino)-ethylamino]-ethylamino]-ethyl]-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 19.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.83 (s, 2H), 7.43–7.39 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.61–6.58 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.48–3.44 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.82–2.61 (m, 14H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.82, 157.09, 138.94, 136.23, 133.85, 124.94, 120.37, 62.12, 53.27, 42.53, 35.58, 34.87, 26.89. MS (ESI) C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 508.1 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 506.2 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-[3-[4-(3-Amino-propoxy)-butoxy]-propyl]-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 20.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.68 (s, 2H), 7.29–7.25 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.47–6.43 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.54–3.46 (m, 8H), 3.38 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.64–2.60 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.73–1.70 (m, 2H), 1.63–1.59 (m, 2H), 1.53–1.51 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.59, 157.12, 138.84, 136.29, 133.83, 124.97, 120.39, 72.66, 70.89, 70.28, 62.09, 40.99, 38.99, 34.38, 31.41, 28.43. MS (ESI) C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub> m/z 523.0 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 521.2 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-[3-[Bis(3-amino-propyl)-amino]-propyl]-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 21.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.82 (s, 2H), 7.42–7.38 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.60–6.56 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.73–2.69 (m, 4H), 2.56–2.51 (m, 8H), 1.70–1.63 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.56, 157.11, 138.86, 136.26, 133.82, 124.94, 120.39, 62.10, 53.71, 53.38, 41.84, 39.86, 31.22, 28.49. MS (ESI) C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> m/z 507.1 (100%, (M + H<sup>+</sup>)), 505.1 (100%, (M - H<sup>-</sup>)).

**(E)-N-[3-[4-(3-Amino-propyl)-piperazin-1-yl]-propyl]-3-(3,5-dibromo-4-methoxy-phenyl)-acrylamide 22.** <sup>1</sup>H NMR (MeOD, 400 MHz): δ 7.80 (s, 2H), 7.40–7.36 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.59–6.55 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.89–2.87 (m, 2H), 2.55–2.48 (m, 14H), 1.78 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (MeOD, 75 MHz): δ 168.62, 157.14, 138.89, 136.25, 133.83, 124.93, 120.39, 62.10, 57.93, 54.76, 54.68, 41.41, 39.84, 28.24, 28.08.

**4.3. Bacterial Strains.** Four bacterial strains were used in this study: *S. aureus* DSM799, *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692), *E. aerogenes* EA289, a Kan derivative of the MDR clinical isolate EA27,<sup>27</sup> and *K. pneumoniae* KPC2 ST258 (Poland). *P. aeruginosa* clinical isolates (PA-LAV) were obtained from E. Garnotel (Laveran Hospital). Strains were maintained at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 15% (v/v) glycerol for cryoprotection. Bacteria were routinely grown in Mueller–Hinton (MH) broth at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**4.4. Antibiotics.** Chloramphenicol and cefepime were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Doxycycline was purchased from TCI Europe. All antibiotics were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and DMSO concentrations up to 5% v/v did not detrimentally affect bacterial growth.

**4.5. Antibiotic Susceptibility Testing.** The susceptibility of bacterial strains to antibiotics and compounds was determined in microplates using the standard broth dilution method in accordance with the recommendations of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).<sup>28</sup> Briefly, the MICs were determined with an inoculum of  $10^5$  CFU in 200  $\mu\text{L}$  of MH broth containing 2-fold serial dilutions of each drug. The MIC was defined as the lowest concentration of drug that completely inhibited visible growth after incubation for 18 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To determine all MICs, the measurements were independently repeated at least three times.

**4.6. Determination of the MICs of Antibiotics in the Presence of Synergizing Compounds.** Briefly, restoring enhancer concentrations was determined with an inoculum of  $10^5$  CFU in 200  $\mu\text{L}$  of MH broth containing 2-fold serial dilutions of each derivative in the presence of the desired antibiotic (chloramphenicol, doxycycline, or cefepime; 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The lowest concentration of ianthelliformisamine derivative that completely inhibited visible growth after incubation for 18 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  was determined. These measurements were independently repeated at least three times.

**4.7. Measurement of ATP Release.** Solutions of compound **21** in doubly distilled water were prepared at different concentrations. A suspension of growing bacteria in MH broth was prepared and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nine hundred microliters of this suspension was added to 100  $\mu\text{L}$  of compound **21** to obtain the indicated final concentration of **21** in the presence or absence of doxycycline. After 5 min, an aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of this mixture was collected and vortexed for 1 s. Fifty microliters of luciferin–luciferase reagent (Yelen, France) was immediately added, and the luminescent signal was quantified using a Lucy luminometer (Yelen, France) for 5 s. The ATP concentration was quantified by the addition of an internal standard. Maximum ATP release was obtained with a 0.02% solution of tetramethylammonium bromide (TMAB).

**4.8. Membrane Depolarization Assays.** Bacteria were grown in MH broth for 24 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at 10 000 rpm at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was discarded, and the bacteria were washed twice with buffered sucrose solution (250 mM) and magnesium sulfate solution (5 mM). The fluorescent dye, 3,3-diethylthiodicarbonyaniline iodide, was added to a final concentration of 3  $\mu\text{M}$ , and it was allowed to penetrate into bacterial membranes during a 1 h incubation at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Compound **21** was then added at different concentrations. Fluorescence measurements were performed using a Jobin Yvon Fluoromax 3 spectrofluorometer with slit widths of 5/5 nm. The relative corrected fluorescence (RCF) was recorded at time intervals of 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 min. The maximum RCF was considered to be that recorded with a pure solution of the fluorescent dye in buffer (3  $\mu\text{M}$ ).

**4.9. Nitrocefin Hydrolysis Assay.** Outer membrane permeabilization was measured using nitrocefin as a chromogenic substrate of periplasmic  $\beta$ -lactamase. Ten milliliters of MH broth was inoculated with 0.1 mL of an overnight culture of PAO1 and grown at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the OD<sub>600</sub> reached 0.5. The remaining steps were performed at room temperature. Cells were recovered by centrifugation (4000 rpm for 20 min) and washed once in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing  $\text{MgCl}_2$  (1 mM). After a second centrifugation, the pellet was resuspended and adjusted to a OD<sub>600</sub> of 0.5. Then, 50  $\mu\text{L}$  of either polymyxin B (positive control) or compound **21** was added

to 100  $\mu\text{L}$  of the cell suspension to obtain a final concentration varying from 0.98 to 500  $\mu\text{M}$ . Fifty microliters of nitrocefin was then added to obtain a final concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nitrocefin hydrolysis was monitored spectrophotometrically by measuring the increase in absorbance at 490 nm. Assays were performed in 96-well plates using a M200 Pro Tecan spectrophotometer.

**4.10. Cytotoxicity toward Chinese Hamster Ovary Cells and Normal Human Fibroblasts.** CHO-K1 cells (ATCC-LGC Standards Sarl, Molsheim, France) and human fibroblasts (Clinisciences, Paris, France) were maintained in McCoy's 5A and DMEM media, respectively, supplemented with 10% bovine calf serum, 2 mM glutamine, and 100 (U/mL)/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  penicillin/streptomycin. They were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . The cell lines were seeded in 96-well plates and incubated overnight. Various concentrations of compounds were incorporated in triplicate cultures, and the cells were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h. At the end of the incubation period, cells were submitted to three successive washes in phosphate buffer saline (PBS) and incubated in PBS containing 10% WST-1 for an additional 30 min. Cell viability was evaluated by measuring WST-1 absorbance at 450 nm in a microplate spectrophotometer. The results are expressed as the percentage of cell viability compared to that of the control (culture medium only), which corresponded to 100% cell viability. Dose–response curves were calculated by nonlinear regression analysis using TableCurve V2 software. The inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) was defined as the concentration of saponin that induced a 50% decrease in cell viability.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Analytical data of all compounds and biological test systems. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: (+33) 491835551. E-mail: [bruneljm@yahoo.fr](mailto:bruneljm@yahoo.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the YELEN Company (Marseille) for assisting with the measurements of ATP release and membrane depolarization.

## ■ ABBREVIATIONS USED

PDR, pandrug resistance; TMAB, tetramethylammonium bromide

## ■ REFERENCES

- (1) Prabhavathi, F. Antibacterial Discovery and Development—The Failure of Success? *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497–1503.
- (2) Labischinski, H.; Barnickel, G.; Bradaczek, H.; Naumann, D.; Rietschel, E. T.; Giesbrecht, P. High State of Order of Isolated Bacterial Lipopolysaccharide and Its Possible Contribution to the Permeation Barrier Property of the Outer Membrane. *J. Bacteriol.* **1985**, *162*, 9–20.
- (3) Vaara, M. Agents that Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 395–411.
- (4) Nikaido, H. Outer Membrane. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*; Neidhardt, F. C., Curtis, R., III, Ingraham, J. L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, 1996; pp 29–47.
- (5) Hancock, R. The Bacterial Outer Membrane as a Drug Barrier. *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 37–42.
- (6) Murata, T.; Tseng, W.; Guina, T.; Miller, S. I.; Nikaido, H. PhoPQ-Mediated Regulation Produces a More Robust Permeability

Barrier in the Outer Membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7213–7222.

(7) Vaara, M. Outer Membrane Permeability Barrier to Azithromycin, Clarithromycin, and Roxithromycin in Gram-Negative Enteric Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 354–356.

(8) Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.

(9) Zasloff, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389–395.

(10) Djouhri-Bouktab, L.; Rolain, J. M.; Brunel, J. M. Polyamines Metabolism, Toxicity and Potent Therapeutical Use. *Anti-Infect. Agents* **2014**, *12*, 95–103.

(11) Brunel, J. M.; Lieutaud, A.; Lome, V.; Pagès, J. M.; Bolla, J. M. Polyamino Geranic Derivatives as New Chemosensitizers to Combat Antibiotic Resistant Gram-Negative Bacteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1174–1179.

(12) Xu, M.; Davis, R. A.; Feng, Y.; Sykes, M. L.; Shelper, T.; Avery, V. M.; Camp, D.; Quinn, R. J. Ianthelliformisamines A–C, Antibacterial Bromotyrosine-Derived Metabolites from the Marine Sponge *Suberea ianthelliformis*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1001–1005.

(13) Pop-Vicas, A. E.; D'Agata, E. M. The Rising Influx of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli into a Tertiary Care Hospital. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1792–1798.

(14) Coelho, J. M.; Turton, J. F.; Kaufmann, M.; Glover, J.; Woodford, N.; Warner, M.; Palepou, M. F.; Pike, R.; Pitt, T. L.; Patel, B. C.; Livermore, D. M. Occurrence of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clones at Multiple Hospitals in London and Southeast England. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3623–3627.

(15) Wang, C. Y.; Jerng, J. S.; Chen, K. Y.; Lee, L. N.; Yu, C. J.; Hsueh, P. R.; Yang, P. C. Pandrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* among Hospitalised Patients: Clinical Features, Risk-Factors and Outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 63–68.

(16) Mentzelopoulos, S. D.; Pratikaki, M.; Platsouka, E.; Kraniotaki, H.; Zervakis, D.; Koutsoukou, A.; Nanas, S.; Paniara, O.; Roussos, C.; Giamarellos-Bourboulis, E.; Routsis, C.; Zakyntinos, S. G. Prolonged Use of Carbapenems and Colistin Predisposes to Ventilator-Associated Pneumonia by Pandrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* **2007**, *33*, 1524–1532.

(17) Antoniadou, A.; Kontopidou, F.; Poulakou, G.; Koratzanis, E.; Galani, I.; Papadomichelakis, E.; Kopterides, P.; Souli, M.; Armaganidis, A.; Giamarellou, H. Colistin-Resistant Isolates of *Klebsiella pneumonia* Emerging in Intensive Care Unit Patients: First Report of a Multiclonal Cluster. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 786–790.

(18) Falagas, M. E.; Kasiakou, S. K. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1333–1341.

(19) Biswas, S.; Brunel, J. M.; Dubus, J. C.; Reynaud-Gaubert, M.; Rolain, J. M. Colistin: An Update of the Antibiotic of the 21st Century. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2012**, *10*, 917–934.

(20) Welling, P. G.; Koch, P. A.; Lau, C. C.; Craig, W. A. Bioavailability of Tetracycline and Doxycycline in Fasted and Nonfasted Subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11*, 462–469.

(21) Mingeot-Leclercq, M. P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 727–737.

(22) Opal, S.; Mayer, K.; Medeiros, A. Mechanisms of Bacterial Antibiotic Resistance. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed.; Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., Eds.; Churchill Livingstone: Philadelphia, PA, 2000; pp 236–252.

(23) Yasuda, K.; Ohmizo, C.; Katsu, T. Mode of Action of Novel Polyamines Increasing the Permeability of Bacterial Outer Membrane. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 67–71.

(24) Lomovskaya, O.; Warren, M. S.; Lee, A.; Galazzo, J.; Fronko, R.; Lee, M.; Blais, J.; Cho, D.; Chamberland, S.; Renau, T.; Leger, R.; Hecker, S.; Watkins, W.; Hoshino, K.; Ishida, H.; Lee, V. J. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents

for Combination Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 105–116.

(25) Matsumoto, Y.; Hayama, K.; Sakakihara, S.; Nishino, K.; Noji, H.; Iino, R.; Yamaguchi, A. Evaluation of Multidrug Efflux Pump Inhibitors by a New Method Using Microfluidic Channels. *PLoS One* **2011**, *6*, e18547.

(26) During the revision of our manuscript, a publication was printed dealing with the synthesis of ianthelliformisamine analogues: Khan, F. A.; Ahmad, S.; Kodipelli, N.; Shivange, G.; Anindya, R. Syntheses of a Library of Molecules on the Marine Natural Product Ianthelliformisamines Platform and Their Biological Evaluation. *Org. Biomol. Chem.* [Online early access]. DOI: 10.1039/C3OB42537A. Published Online: Feb 24, 2014.

(27) Malla, M.; Chevalier, J.; Bornet, C.; Eyraud, A.; Davin-Regli, A.; Bollet, C.; Pagès, J. M. Porin Alteration and Active Efflux: Two in Vivo Drug Resistance Strategies Used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **1998**, *144*, 3003–3009.

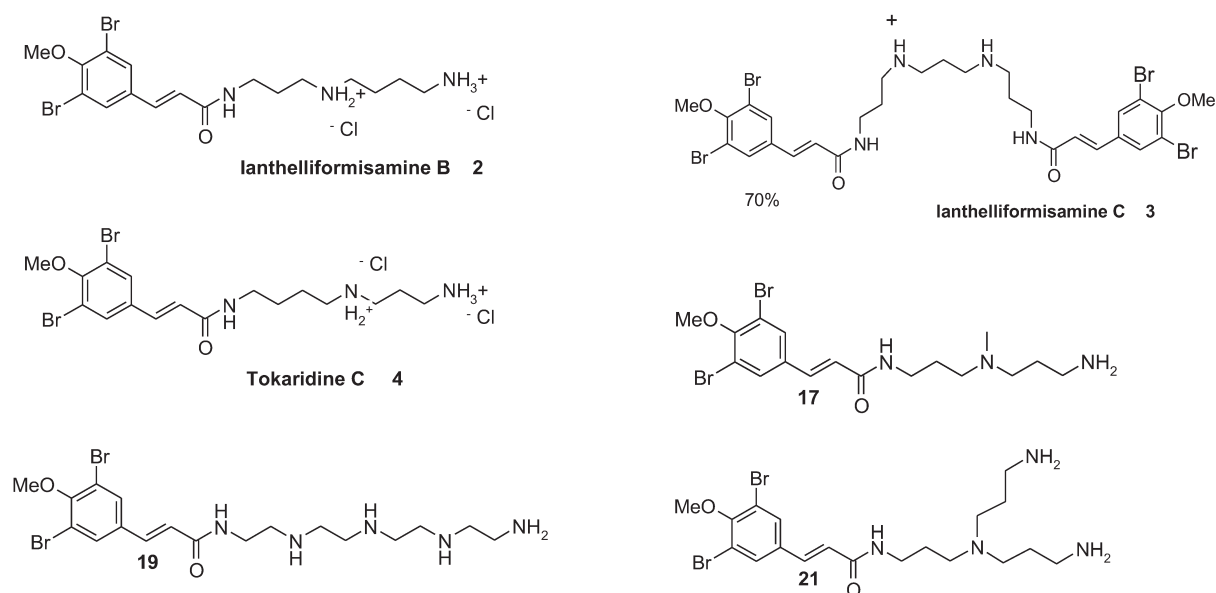
(28) Members of the SFM Antibiogram Committee. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Report 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *21*, 364.



## DISCUSSION ARTICLE 1 :

Dans cette étude nous avons décrit la synthèse de nouvelles molécules d'origine naturelle, issues de l'éponge marine *S. ianthelliformis*, et considéré leur utilisation en combinaison avec des ATBs afin de proposer une solution pour lutter contre la résistance bactérienne. Nous avons étudié l'effet potentialisateurs des dérivés sur des pathogènes présentant une relevance clinique majeure, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* et *S. aureus*.

Comme nous l'avons montré, les dérivés n'exercent pas d'activité antibactérienne intrinsèque comme en témoigne les mesures de CMI à l'exception des dérivés naturels et du composé ianthelliformisamine C dont les CMI sont comprises entre 12,5 et 100  $\mu\text{g/mL}$  selon l'espèce considérée. L'utilisation des dérivés en combinaison avec des ATBs a permis de mettre en évidence que des composés naturels (dérivés **2-4**) et synthétiques (dérivés **17, 19, 21**) permettent de restaurer la sensibilité à la doxycycline des souches EA289, PA01, et KPC2 ST258 à de faibles concentrations d'utilisation.



Nous avons également observé que ces mêmes composés naturels et synthétiques étaient capables de potentialiser l'activité du céfépime à de faibles concentrations alors que des concentrations plus importantes étaient nécessaires pour obtenir le même effet avec le chloramphénicol. Le composé **21** ayant montré une très forte synergie avec le céfépime sur PA01, nous avons évalué son activité adjuvante sur 20 isolats cliniques

multirésistants de *P. aeruginosa*. Des concentrations du composé **21** allant de 12,5 à 50  $\mu\text{M}$  ont permis de restaurer la sensibilité des isolats à la doxycycline, cependant 5 souches demeurent résistantes. Il est intéressant de noter que ces isolats résistants à la combinaison doxycycline / dérivé **21** sont également résistants à la gentamycine. Communément, la résistance à la gentamycine est associée à un défaut de transport ou à une imperméabilité membranaire, ce mécanisme conférant une résistance croisée avec tous les autres aminosides. Cela pourrait expliquer l'inefficacité du composé **21** sur ces isolats. En effet, après avoir étudié le mode d'action du composé **21** nous avons pu mettre en évidence l'absence de perméabilisation de la membrane. De fait, aucune fuite d'ATP dans le milieu extracellulaire n'a pu être mesurée ce qui traduit l'absence de dommage causé à la membrane en présence du composé **21** testé aux concentrations synergiques. Afin de confirmer ces résultats nous avons réalisé un test complémentaire, le test d'hydrolyse de la nitrocéfine, permettant également d'évaluer l'intégrité de la membrane externe. La nitrocéfine est un  $\beta$ -lactame chromogénique de couleur jaune, substrat des  $\beta$ -lactamases périplasmiques et dont le produit d'hydrolyse devenant rouge/orange absorbe à 490 nm. Lorsque la membrane est intègre, la nitrocéfine ne diffuse que très légèrement à travers la membrane externe alors qu'en présence d'un perméabilisant la cinétique d'hydrolyse est très rapide. Grâce à ce test nous avons pu confirmer que l'intégrité de la membrane externe n'est pas affectée, même en présence de fortes concentrations de composé **21**. D'autre part, nous avons mesuré une dépolarisation membranaire dose-dépendante, le niveau maximal de fluorescence est atteint au bout de 3 minutes pour une concentration de 200  $\mu\text{M}$ , ce qui traduit une atteinte importante de la FPM par le composé. Les pompes d'efflux utilisant le gradient de protons comme source d'énergie, toutes les données suggèrent fortement que la potentialisation des ATBs par le composé se fait par une augmentation intracellulaire des ATBs *via* le blocage des pompes d'efflux lui-même causé par une déstabilisation de la FPM.

## ARTICLE 2 :

**Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro.** Diane Borselli, Aurélie Lieutaud, Hélène Thefenne, Éric Garnotel, Jean-Marie Pagès, Jean Michel Brunel, Jean-Michel Bolla. PLoS One. 6 ; 11(5), 10.1371/journal.pone.0154490

Le phénomène d'antibiorésistance est un problème de santé publique mondial, et le développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections bactériennes est urgent. Les autorités nationales et internationales encouragent l'usage raisonné des antibiotiques ainsi que le développement de nouvelles molécules. Cependant, l'identification de molécules actives sur les bactéries Gram négatives représente un défi majeur principalement causé par un défaut d'accumulation de l'antibiotique près de sa cible. En effet, la faible perméabilité membranaire qui constitue une véritable barrière pour les molécules hydrophiles, associée à la présence d'un efflux actif diminuent grandement la concentration intracellulaire. Ainsi, les méthodes de criblage basées sur la cible purifiée sont régulièrement confrontées au problème de l'imperméabilité (359). Dans ce contexte, nous avons choisi de réaliser un criblage de nos molécules sur les cellules entières afin d'adresser la résistance naturelle de *P. aeruginosa* vis-à-vis de la doxycycline.

Le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* présente une imperméabilité membranaire nettement supérieure à celle de *E. coli* ce qui lui confère un niveau de résistance intrinsèque très élevé. A cette imperméabilité membranaire s'ajoute la présence d'autres déterminants de la résistance comme l'expression constitutive de  $\beta$ -lactamases et de pompes d'efflux tripartites de type RND. MexAB-OprM et MexXY-OprM sont les pompes les plus fréquemment retrouvées dans les isolats cliniques. A l'inverse de MexAB-OprM dont l'expression est constitutive (360), MexXY-OprM est inductible par certains ATBs, notamment les tétracyclines et les macrolides (38) et contribue à la fois à la résistance naturelle et acquise de la bactérie. *P. aeruginosa* représente donc un défi thérapeutique.

Le but de cette étude était de sélectionner un ATB vis à vis duquel la bactérie est naturellement résistante et d'utiliser en combinaison avec celui-ci une molécule chimio-sensibilisante, à l'image du modèle  $\beta$ -lactame/ inhibiteur de  $\beta$ -lactamases. Ainsi cette



stratégie permettrait d'élargir l'arsenal thérapeutique disponible actuellement avec des molécules ATBs existantes. Dans une étude antérieure conduite au laboratoire, il a été mis en évidence que certains dérivés du géranol possédaient des activités adjuvantes d'ATBs chez les Entérobactéries (354). Dans cette étude nous avons donc décrit l'utilisation de ces dérivés polyamino-isopréniques comme agents chimio-sensibilisants afin de restaurer l'activité de la doxycycline. L'étude du mode d'action de ces composés suggère fortement qu'ils agissent directement sur la résistance intrinsèque ce qui permet d'envisager ce type de thérapie combinatoire à la fois sur une souche sensible et résistante.

RESEARCH ARTICLE

# Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol *In Vitro*

Diane Borselli<sup>1</sup>, Aurélie Lieutaud<sup>1</sup>, Hélène Thefenne<sup>1,2</sup>, Eric Garnotel<sup>1,2</sup>, Jean-Marie Pagès<sup>1</sup>, Jean Michel Brunel<sup>3</sup>, Jean-Michel Bolla<sup>1\*</sup>

**1** Aix-Marseille Université, IRBA, TMCD2 UMR-MD1, Faculté de Médecine, 13385 Marseille, France, **2** Hôpital d'Instruction des Armées Alphonse-Laveran, 13013 Marseille, France, **3** Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), CNRS, UMR7258, Institut Paoli Calmettes, Aix-Marseille Université, UM 105, Inserm, U1068, F-13009, Marseille, France

\* [jean-michel.bolla@univ-amu.fr](mailto:jean-michel.bolla@univ-amu.fr)



OPEN ACCESS

**Citation:** Borselli D, Lieutaud A, Thefenne H, Garnotel E, Pagès J-M, Brunel JM, et al. (2016) Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol *In Vitro*. PLoS ONE 11(5): e0154490. doi:10.1371/journal.pone.0154490

**Editor:** Eric Cascales, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, FRANCE

**Received:** November 3, 2015

**Accepted:** April 14, 2016

**Published:** May 6, 2016

**Copyright:** © 2016 Borselli et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Aix-Marseille University funded the work.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Multidrug resistant bacteria have been a worldwide concern for decades. Though new molecules that effectively target Gram-positive bacteria are currently appearing on the market, a gap remains in the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria. Therefore, new strategies must be developed against these pathogens. The aim of this study was to select an antibiotic for which a bacterium is naturally resistant and to use an escort molecule to restore susceptibility, similarly to the model of  $\beta$ -lactam/  $\beta$ -lactamase inhibitors. High-content screening was performed on the reference strain PA01, allowing the selection of four polyamino-isoprenic compounds that acted synergistically with doxycycline. They were assayed against clinical isolates and Multi-Drug-Resistant strains. One of these compounds was able to decrease the MIC of doxycycline on the reference strain, efflux pump overproducers and clinical isolates of *P. aeruginosa*, to the susceptibility level. Similar results were obtained using chloramphenicol as the antibiotic. Membrane permeation assays and real-time efflux experiments were used to characterize the mechanism of doxycycline potentiation.

The results showed that the selected compound strongly decreases the efficiency of glucose-triggered efflux associated with a slight destabilization of the outer membrane. According to these data, targeting natural resistance may become an interesting way to combat MDR pathogens and could represent an alternative to already devised strategies.

## Introduction

With the current global crisis of antibiotic resistance, any strategy that could improve the therapeutic tools used in the fight against bacterial infections must be utilized [1]. National and International health agencies have successfully established a series of measures to encourage the control of the usage of drugs and the development of new molecules. Although significant progress has been made in the fight against Gram-positive infections in the last decade, a gap

remains in the treatment of Gram-negative bacteria, particularly in the discovery of new active molecules [2, 3]. Effective Gram-positive targeting molecules are globally not very active against Gram-negative bacteria, though the same targets exist in both types of bacteria [4]. In the latter, the major problem of antibiotic entry and accumulation of the drug near the target has not yet been solved [5]. This is due, in part, both to the low permeability of Gram-negative bacteria, which are surrounded by the outer membrane, that decreases the entry of compounds and to the constitutive expression of efflux pumps by these bacteria [6, 7]. Moreover, it is well documented that they are able to overproduce these efflux pumps in response to extra-cellular compounds, including drugs [8]. Thus, screenings based on an *in vitro* test for a particular target face the recurring problem of the permeability of Gram-negative bacteria [9].

Therefore, it may be interesting to first identify molecules effective on whole bacteria and then, if the test is positive, search for their mode of action. We used this approach to address the question of the natural resistance of *Pseudomonas* to doxycycline.

The aim of this study was to select an antibiotic for which a bacterium is naturally resistant and to use an escort molecule to restore susceptibility, similarly to the model of  $\beta$ -lactam/  $\beta$ -lactamase inhibitors. This strategy could constitute an opportunity for an old neglected molecule to be rejuvenated by using an adjuvant to improve its action.

*Pseudomonas aeruginosa* represents a serious therapeutic challenge for both community-acquired and nosocomial infections. *P. aeruginosa* possesses an intrinsic high-level antibiotic resistance due a naturally low permeable outer membrane (1/100 of *E. coli* outer membrane). It makes the bacterium resistant to many classes of antibiotics [8]. Together with impermeability, the low susceptibility of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactam antibiotics results from the overexpression of the intrinsic AmpC cephalosporinase, and the acquisition of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, of metallo-carbapenemases, and extended spectrum oxacillinases [10].

In addition, the inherent resistance of *P. aeruginosa* is, to a great extent, due to an active efflux of a broad spectrum of molecules. This efflux is mediated by three-component systems that belong to the Resistance Nodulation cell Division family of transporters (RND). MexA-B-OprM and MexXY-OprM are the most studied [11–13] and the most prevalent in clinical isolates [14]. MexAB-OprM is constitutively expressed and confers the ability to export several classes of drugs [15]. The expression of MexXY-OprM contributes to both intrinsic and acquired resistance [16], and this resistance can be induced by antibiotics such as tetracyclines and macrolides [16].

In an on-going project dedicated to the synthesis of new biologically active molecules, we identified several polyamino-isoprenic derivatives that were able to decrease chloramphenicol- and nalidixic acid-resistance levels of multi-drug-resistant Enterobacterial strains [17].

In the present study, we describe the use of this chemical library to screen chemosensitizers that could lower the MIC of doxycycline on *P. aeruginosa* under the threshold of susceptibility. We also present data supporting the concept that polyamino-isoprenic compounds potentiate doxycycline's action by circumventing the intrinsic resistance.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and growth conditions

The *P. aeruginosa* strains used in this study are described in [Table 1](#). In addition, a series of 20 clinical isolates of *P. aeruginosa* obtained from the Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, HIA-Laveran (Marseille, France) were also used in this study ([S1 Table](#)). Strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 15% (v/v) glycerol for cryo-protection. Bacteria were routinely maintained on Mueller-Hinton (MH) agar plates and grown in cation-adjusted MH broth (MHbII) at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Table 1. Strains used in this study and their susceptibilities to doxycycline, chloramphenicol, and the compounds 1–4.**

Strains	Relevant phenotype	Source and reference	Minimal Inhibitory Concentration mg/L ( $\mu$ M)*					
			DOX	CHL	1	2	3	4
PA01	wt	P. Plésiat [20]	32	256	> 85 (>250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	49 (125)
PT629	Mex AB overproducer	P. Plésiat [21]	>32	512	> 85 (>250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	49 (125)
PA01 ERY <sup>R</sup>	Mex CD overproducer	P. Plésiat [22]	16	256	> 85 (>250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	25 (62.5)
PA0-7H	Mex EF overproducer	P. Plésiat [23]	>32	>1024	85 (250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	49 (125)
CMZ091	Mex XY overproducer	P. Plésiat [24]	32	256	85 (250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	49 (125)
FB1	Mex B deleted	P. Plésiat [25]	32	8	85 (250)	> 81 (>250)	25 (62.5)	49 (125)

DOX, doxycycline; CHL, chloramphenicol.

\* Results are the mean of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.t001

## Antibiotics and chemicals

The antibiotics doxycycline, polymyxin-B polymyxin-B nonapeptide (PMBN) and chloramphenicol and Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PA $\beta$ N), carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) and benzalkonium chloride were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France). EDTA was from Fisher-Scientific (Quichy-le-château, France) The antibiotic imipenem was purchased from Pharmacopeia (USA). They were dissolved in water or dimethyl sulfoxide (DMSO) as indicated. The polyamino-isoprenic derivatives were described previously [18]. They were dissolved in DMSO and stored at -20°C until use.

## Antibiotic susceptibility testing

Assays were carried out in 96-well microtiter plates using a two-fold standard broth microdilution method, as previously described [19]. Experiments were performed on the BAC-SCREEN platform of the UMR-MD1, with a Freedom EVO 150 liquid handling system (Tecan, Lyon, France). The MIC of doxycycline, chloramphenicol and of the 4 compounds for each strain is given in Table 1.

## High-content screening

The polyamino-isoprenic compounds library [18] was screened against the *P. aeruginosa* PA01 reference strain (Table 1) in the presence of 4 mg/L doxycycline that corresponds to the concentration under the threshold of resistance according to the CLSI guidelines, in order to evaluate if one of the compound is able to decrease the intrinsic resistance of *P. aeruginosa*. For further experiments we decided to reduce the concentration of doxycycline at 2mg/L to increase the stringency of the tests. Indeed, this concentration corresponds to the threshold of the susceptibility according to the CLSI. The screening was carried out in 96-well microtiter plates using MHBII, in a final volume of 200  $\mu$ L. The concentration of library compounds was 10  $\mu$ M, with a final DMSO concentration of 2.5%. The bacterial inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/mL was prepared from an overnight culture. In addition to the polyamino-isoprenic compounds, each plate contained PA $\beta$ N, CCCP, CTAB, polymyxin-B and benzalkonium chloride as control molecules. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions for 18 hours. Plates were read at 600 nm on an Infinite M200 Pro plate reader (Tecan). Results are summarized in S1 Fig.

## Comparison of efficiency between compounds and PA $\beta$ N

Serial dilutions of each compound (from 270  $\mu$ M to 0.95  $\mu$ M for PA $\beta$ N and from 135  $\mu$ M to 0.06  $\mu$ M for 3) were prepared in microplates. Doxycycline (2 mg/L) was then added to each well before inoculation of bacteria ( $5 \times 10^5$  cfu/mL). Optical density (600 nm) was measured after 18 hours at 37°C. Only the relevant part of the graphs are shown. Experiments were performed in triplicate.

## Checkerboard assay

Serial two-fold dilutions of antimicrobial agents were mixed together in a microtiter plate. The range of concentration of each drug was twice the MIC, down to the eleventh serial two-fold dilutions below this amount. Doxycycline was serially diluted along the X-axis, and the polyamino-isoprenic compound or PA $\beta$ N was diluted along the Y-axis as indicated. Each well was inoculated with a bacterial inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/ml, and the plates were incubated at 37°C for 18 h under aerobic conditions. Each plate also contained a row and a column in which a serial dilution of polyamino-isoprenic compound or doxycycline, respectively, was present alone to determine the MIC. The FIC index was calculated as follows: FIC index = FIC A + FIC B, where FIC A is the MIC of drug A in the combination/MIC of drug A alone and FIC B is the MIC of drug B in the combination/MIC of drug B alone. The combination was considered synergistic when the FIC index is  $\leq 0.5$ , and antagonistic when the FIC index is  $> 4$  [26]. Results are described in [S2 Table](#).

## Effect of combined antibiotics–polyamino-isoprenic derivatives

MH agar plates were prepared, containing 2 mg/L doxycycline and 2 mg/L doxycycline in combination with compounds at a concentration of 10  $\mu$ M. Bacteria, 5  $\mu$ L of a suspension of each clinical isolate adjusted to  $5 \times 10^5$  colony-forming units per ml were spotted on each plate and growth was monitored after a 18 h period of incubation at 37°C. The isolates that repeatedly grown on the plates containing doxycycline alone and compound alone but that did not grow on both doxycycline and compound, were identified as susceptible of the combination.

In a second experiment, 5  $\mu$ L of logarithmic dilutions of an overnight culture of the 6 strains described in [Table 1](#) were spotted on the MH agar plates prepared as above. An additional assay was also performed with these 6 strains using chloramphenicol as antibiotic instead of doxycycline.

## Outer membrane permeation assay

An overnight culture of PA01 was diluted 100-fold into 10 ml MHII broth containing 0.01  $\mu$ g/ml of imipenem to induce a higher level of  $\beta$ -lactamases. After reaching an OD<sub>600 nm</sub> of 0.5, cells were recovered by centrifugation (4,000 X g for 20 min) and washed twice in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) supplemented with 1 mM MgCl<sub>2</sub> (PPB) at an OD<sub>600 nm</sub> of 0.5. 50  $\mu$ l of each compound was added to 100  $\mu$ l of the cell suspension, yielding final concentrations ranging from 125  $\mu$ M to 15.6  $\mu$ M. Then, 50  $\mu$ l of nitrocefin was added to obtain a final concentration of 50  $\mu$ g/ml. Absorbance at 490 nm was monitored by spectrophotometry using an Infinite M200 microplate reader (Tecan) over 60 min. Experiments were performed in triplicate. For each compound, the efficacy of permeation was determined using the slope in the linear range, relatively to the slope obtained with 250  $\mu$ M polymyxin-B.

## Real-time efflux assay

The experiments were performed as previously described [17] with slight modifications. For each strain, 20 mL of MHII was inoculated with a single colony from a fresh plate and grown at

37°C to the stationary phase. The cells were then recovered by centrifugation (4,000 X g for 20 min) and washed once in 20 mM PPB. They were then loaded over night with the dye 1,2'-dinaphthylamine (TCI-Europe SA, Zwijndrecht, Belgium) at a final concentration of 32 µM, in the presence of 5 µM CCCP. The cell suspension was then recovered by centrifugation (4,000 X g for 20 min) and re-suspended in the same volume of PPB and adjusted to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.5. In a 96-well Greiner black microplate (Greiner, Courtaboeuf, France), a gradient of inhibitor (when used) was prepared in PPB, and bacteria were added (100 µL per well). The fluorescence of the cell suspension, was monitored each 22 sec during 1200 sec on an Infinite M200 microplate reader (Tecan; excitation wavelength 370 nm and emission wavelength 420 nm). In order to trigger the transport, glucose (50 mM final concentration) is added at 200 sec. The maximum efficacy of the efflux is the difference between the value obtained without and with glucose addition after 1200 sec. For each compound, the efficiency of efflux inhibition is calculated as the difference between the maximum efficacy of transport and the residual transport obtained at various concentrations of the compound.

### Cytotoxicity assessment

CHO-K1 cells (ATCC-LGC Standards Sarl (Molsheim, France) and human fibroblasts (Clinisciences, Paris, France) were maintained in McCoy's 5A and DMEM media, respectively, supplemented with 10% bovine calf serum, 2 mM glutamine, and 100 U/mL/10 µg/mL penicillin/streptomycin. They were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cell lines were seeded in 96-well plates and incubated overnight. The cytotoxic effects of compounds were assessed by the colorimetric WST-1 cell proliferation assay as previously described [17]. Briefly, a range of compound concentrations from 30 µM to 1200 µM was added to triplicate cultures, and cells were incubated at 37°C for 24 h. At the end of the incubation period, cultures were washed three times with phosphate buffer saline (PBS) and incubated in fresh culture medium containing 10% WST-1 for an additional 30 min. Cell viability was evaluated by measuring the WST-1 absorbance at 450 nm in a microplate spectrophotometer MRX1 II (Dynex technologies, Chantilly, VA, USA). The Inhibitory Concentration 50% (IC<sub>50</sub>) was chosen to evaluate the cytotoxicity of compounds. IC<sub>50</sub> was defined as the concentration of a compound that induced a 50% decrease in viable cells. Doxorubicin was used as a positive control.

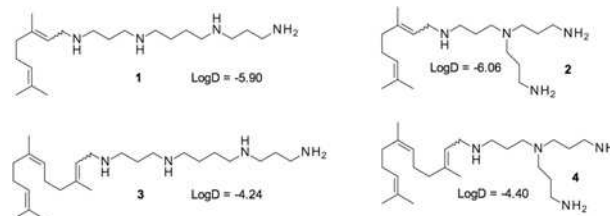
### Statistical analysis

Data were analyzed using the student t-test analysis for differences between two groups, and findings were expressed as mean + SD. All assays included 2 replicates and were repeated in at least 2 independent experiments. A p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### Selection of polyamino-isoprenic compounds

A series of 60 compounds, which were described [18], were tested at a concentration of 10 µM in combination with a sub-inhibitory concentration of doxycycline against the reference strain of *P. aeruginosa* PA01. In parallel, we evaluated the intrinsic antimicrobial activity of these compounds alone to allow the selection of only doxycycline adjuvants. The results are summarized in S1 Fig. Under these conditions, three compounds, 2–4 (Fig 1), were able to decrease the MIC of PA01 for doxycycline below the threshold of resistance (4 mg/L), [27]. Interestingly, these three compounds share similar structures with however, very distinct LogD values (Fig 1). Compounds 2 and 4 share the same polyamine and only differ in their isoprenyl



**Fig 1. Structure of polyamino-isoprenic derivatives 1–4 identified in this study.** LogD have been determined by using chemical simulation software Marvin Sketch 5.11.3.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.g001

moiety. Conversely, 3 and 4 share the same isoprenyl group and differ in their polyamines. In the subsequent experiments, we also considered compound 1, which has the same isoprenyl group as 2 and the same polyamine as 3 but did not show any significant synergy.

### Cytotoxicity of the selected compounds

The cytotoxicity on Chinese Hamster Ovary cells and human normal fibroblasts, was determined using the metabolic WST1 assay for the four compounds (Table 2). Compound 1 appeared to be the least cytotoxic on both cell lines, with values ranging from 20 times for the CHO to 10 times for human fibroblasts compared with the positive control, the doxorubicin. Compounds 2 and 3 showed similar values that were lower than those of 1 but still clearly above those of doxorubicin for the CHO cell line. Compared with 2 and 3, compound 4 exhibited the same toxicity on CHO cells and lower toxicity on human fibroblasts.

### Efficacy comparison of the selected compounds

PA01 is a well-studied reference strain of *P. aeruginosa*, however to extend our study we considered strains recently isolated from hospitalized patients [21–25]. Thus, we decided to test this combination of doxycycline (2mg/L) with polyamino-isoprenic compounds (10 μM) on twenty clinical isolates recently isolated from the HIA-Laveran (see M&M section and S1 Table).

Parent derivatives 1 and 2 showed only a slight efficacy, restoring doxycycline susceptibility in only 27% and 6% of the isolates, respectively. Compounds 4 restored the doxycycline susceptibility of 88% of the isolates (Fig 2), whereas compound 3 led to a total susceptibility of all the considered isolates with a MIC ratio of 32 (S1 Table). We concluded that compound 3 was the best compound and suitable for a more detailed study. The same experiment was performed using chloramphenicol (4 mg/L) in combination with 3 (10 μM final concentration). Amongst the 20 clinical isolates, the growth of 15 (75%) was impaired, while 5 (25%) were resistant (data

**Table 2. WST1 cytotoxicity test of the compounds.**

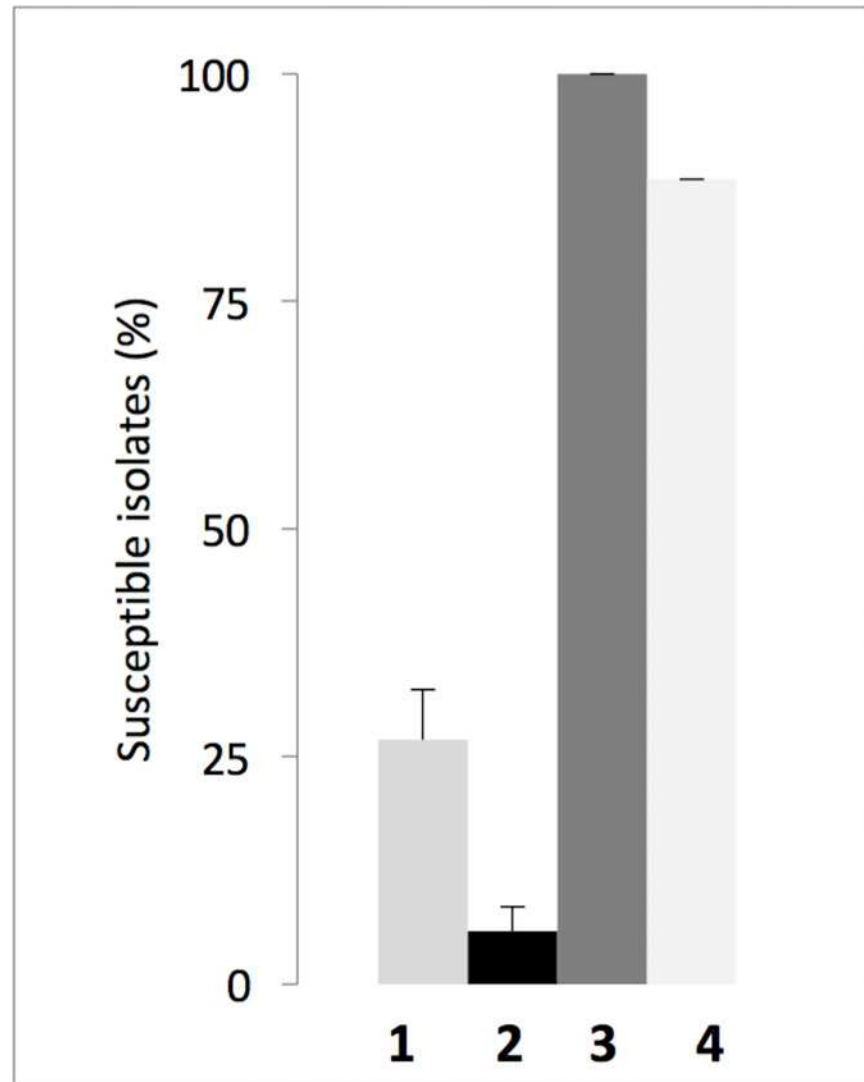
Compound	CHO	Fibroblast
	IC <sub>50</sub> (μM)*	IC <sub>50</sub> (μM)*
1	808 +/- 68.1	138 +/- 18.6
2	235.5 +/- 28.9	Nd**
3	320.5 +/- 41.2	Nd**
4	363 +/- 20.3	136 +/- 7.9
Doxorubicin	48.3 +/- 6.8	12.4 +/- 2.1

\* mean +/- Standard deviations, data are obtained from 2 independent experiments

\*\* Not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.t002





**Fig 2. Susceptibility of clinical isolates of *P. aeruginosa* to treatment with doxycycline in combination with various polyamino-isoprenic derivatives.** The percentage of susceptible isolates to doxycycline (2 mg/L) supplemented with one of the compounds (10  $\mu$ M) was determined for each combination. grey bar, black bar, dark grey bar, and white filled bar, correspond to compounds 1, 2, 3 and 4 respectively. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.g002

not shown). These experiments were performed to study the effect of our compounds on the natural resistance of *P. aeruginosa*. In addition, we were wondering if compound 3 could also increase susceptibility to other antibiotic families including  $\beta$ -Lactams, fluoroquinolones and aminoglycosides, that are representative of the main classes of anti-pseudomonal agents. Experiments were performed with the  $\beta$ -lactams ceftazidime and ticarcillin and ciprofloxacin and amikacin. Results are summarized in [S3 Table](#). We found that, neither compound 3 nor PA $\beta$ N (used as a control) showed significant synergy with ceftazidime on all the strains tested. A slight effect however, was observed in the combination of 3 with ticarcillin on all the strains. No synergistic effect of 3 with ciprofloxacin was observed with the exception of PA0-7H (that overproduces MexEF) where a 4 times decrease of MIC was measured. Conversely, a surprising increase of the MIC of amikacin was caused by 3 on every strains, this could be attributed to



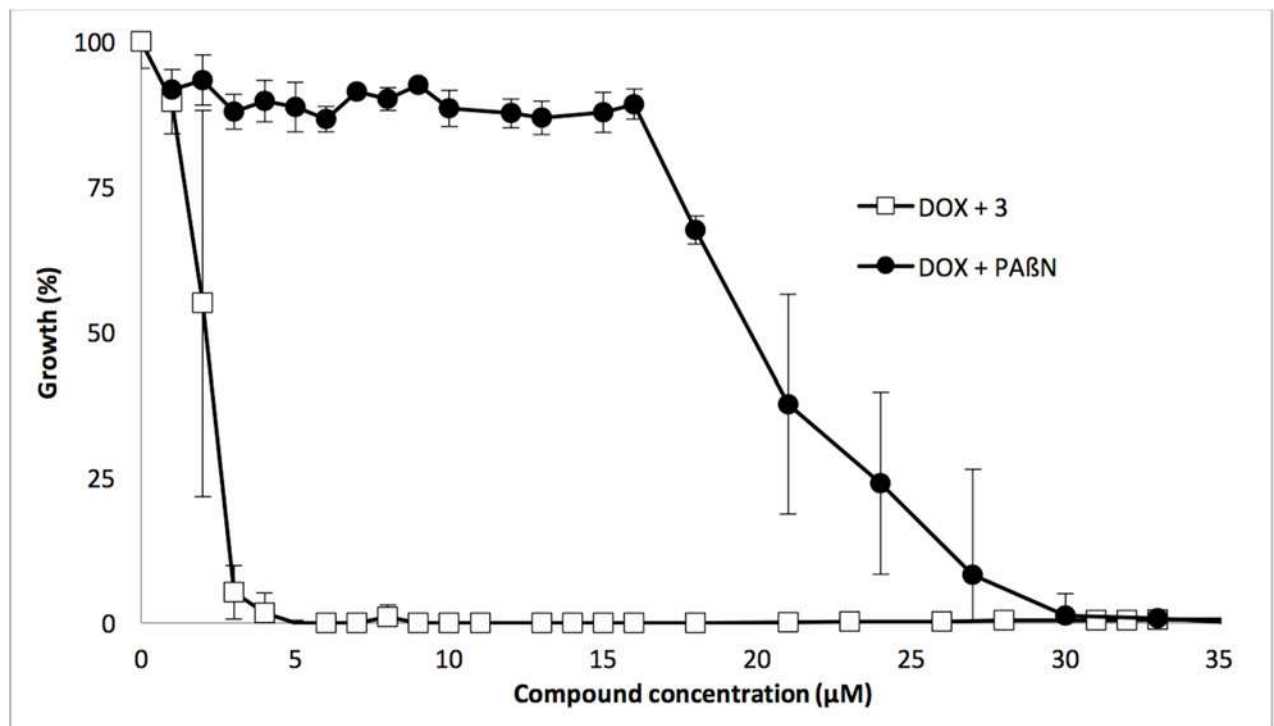
the deleterious effect of **3** on the proton gradient (see below), indeed the influx of aminoglycosides into bacteria is depending on the proton gradient through the inner membrane [28]. To better characterize compound **3**, we first searched for the minimum concentration of compound that allowed killing of bacteria by doxycycline, and PA $\beta$ N was used as the reference molecule.

**Determination of the minimum efficient concentration of compound 3.** PA $\beta$ N is the most characterized efflux pump inhibitor (EPI) in *P. aeruginosa*. Initially considered a promising alternative to prevent antibiotic resistance, its use as a prospective drug was discontinued because of its toxicity [29]. Nevertheless, it remains a useful tool for studying resistance of Gram-negative bacteria. The efficiency of compound **3** was further compared with that of PA $\beta$ N.

First, we performed a checkerboard assay to analyze the synergy between doxycycline and the polyamino-isoprenic compound and between doxycycline and PA $\beta$ N. For both, compound **3** and PA $\beta$ N we observed a synergistic inhibition of growth when combined with doxycycline with a FIC Index of 0.09 (S2 Table). Nevertheless, to more precisely refine these results, we fixed the concentration of interest of doxycycline at 2 mg/L (see above) and tested a gradient of concentrations for PA $\beta$ N and **3**. PA $\beta$ N is generally used at a concentration greater than 10  $\mu$ M to inhibit the resistance of *P. aeruginosa* with respect to various antibiotics [30], and, to our knowledge, no data have been reported in the literature on its use in combination with doxycycline. The percentage of growth inhibition was monitored as a function of compound concentration, and the results are presented in Fig 3. Under these conditions, it clearly appears that at least a 30  $\mu$ M (15.6 mg/L) concentration of PA $\beta$ N is necessary to efficiently inhibit the growth of *P. aeruginosa* in the presence of sub-inhibitory concentration of doxycycline, which is in agreement with the efficacy of PA $\beta$ N to restore fluoroquinolone susceptibility of *Pseudomonas* [30]. Conversely, a concentration of approximately 3  $\mu$ M (1.22 mg/L) of **3** was sufficient to significantly inhibit PA01 growth (Graphically determined on Fig 3) and confirmed with the checkerboard assay (S2 Table). According to these data, **3** appears to be a stronger adjuvant of doxycycline than does PA $\beta$ N *in vitro*. This first set of assays was performed on the reference strain PA01, which exhibits only a natural resistance towards doxycycline.

## Action of compound 3 on efflux pumps

We hypothesized that if compound **3** targets the intrinsic resistance, it should also be effective on strains with acquired resistance, such as through the efflux mechanisms which are well known to contribute to the MDR phenotype [31]. The strains overproducing the major efflux pumps of *P. aeruginosa* used in this experiment are listed in Table 1. All of the strains grew well on the agar medium containing 2  $\mu$ g/mL of doxycycline (Fig 4). In contrast, in the presence of both, doxycycline and **3**, PA01 or strains overproducing either MexCD or MexEF cells growth was observed when a dilution of  $10^{-2}$  was plated on MH. Cells overproducing either MexAB or MexXY grew at a higher dilution ( $10^{-4}$ ). Nevertheless, in all cases, no growth was observed above a dilution of  $10^{-5}$ . Moreover, the cells from the  $\Delta$ mexB strain did not grow at any of the dilutions, in accordance with the contribution of MexAB-OprM to cycline resistance [15]. According to these data we wondered if compound **3** could also restore or at least increase susceptibility of *Pseudomonas* to other antibiotics. We thus decided to test chloramphenicol because *P. aeruginosa* also exhibit a high level of intrinsic resistance to this drug (Table 1). Similar results were obtained at least for strains PA01 and CMZ091 and to a lesser extent for PA01-ERY<sup>r</sup>. For PT629 and PA0-7H a slight effect was also observed, (Fig 4b). These data suggest that the selected compound was able to efficiently affect resistance to different classes of antibiotic.



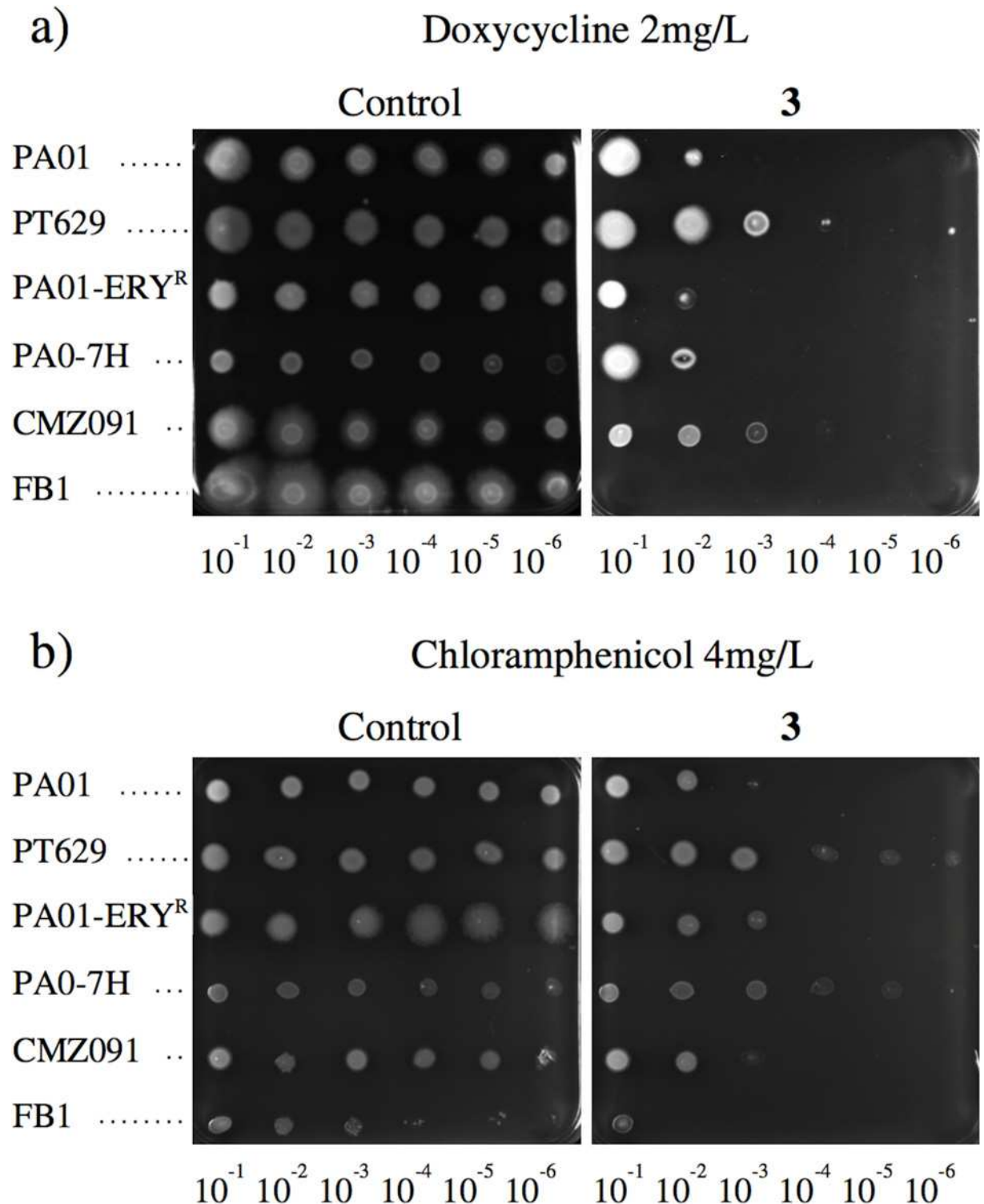
**Fig 3. Comparison of the synergistic activity of PAβN and compound 3 with doxycycline.** Bacterial growth corresponding to each concentration of compound was calculated as a percentage of bacterial growth under the same conditions without the addition of compound. Black filled circles, PAβN; open squares, Compound 3. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.g003

Taken together, these results demonstrate that the combination of doxycycline and 3 increases susceptibility of all the strains of *P. aeruginosa* overproducing the major efflux pumps, suggesting a possible inhibition of this resistance mechanism. According to these data and to the hyper-susceptibility of the *mexB* deficient mutant observed in Fig 4, we hypothesized that 3 could inhibit the efflux pumps of *P. aeruginosa*. However, at this time, we could not exclude the possibility that increased permeability might also explain the results obtained.

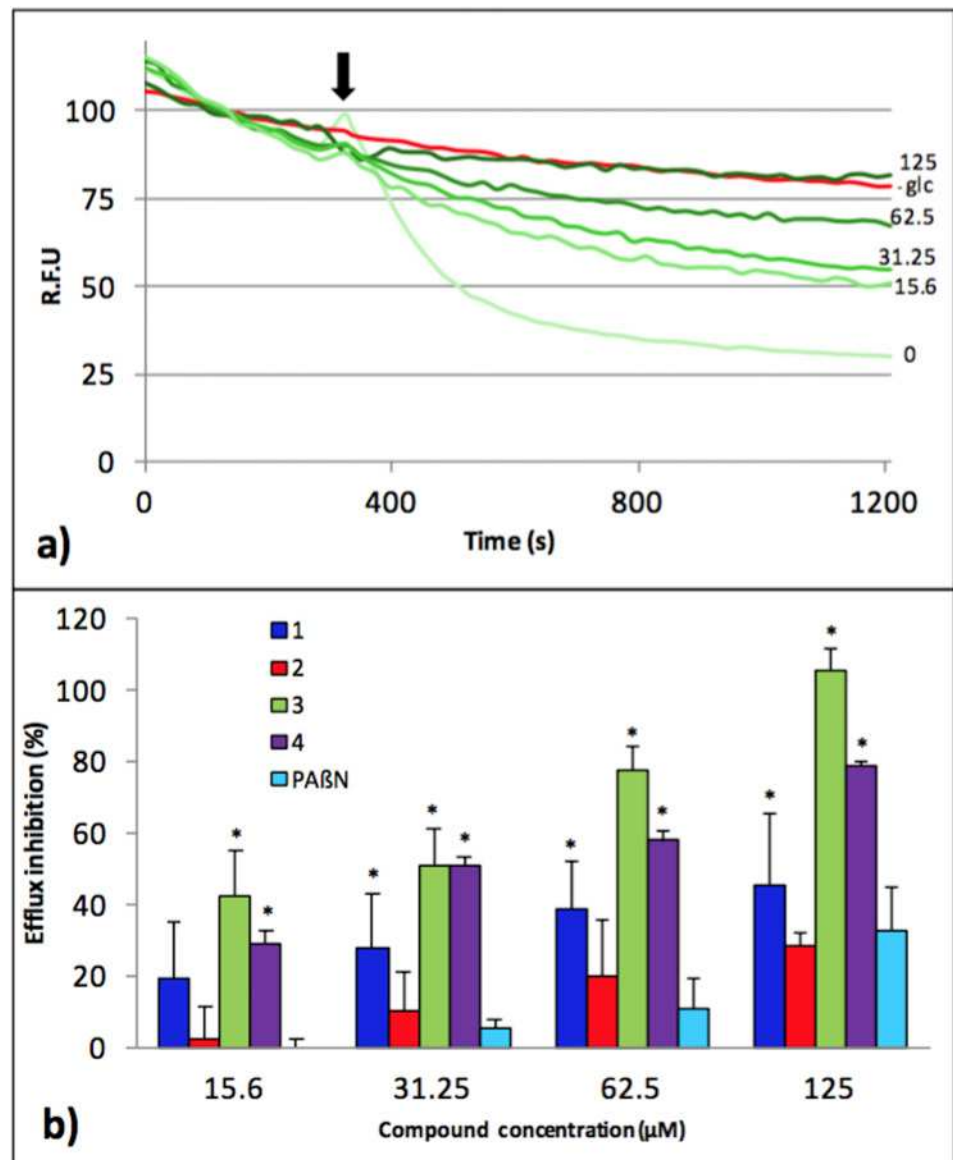
To better understand whether these compounds were actually able to inhibit efflux, we developed a real-time efflux assay for *Pseudomonas* that was previously described for *Enterobacteriaceae* [17]. As shown in Fig 5A, the strain PA01 was able to efficiently expel 75% of the preloaded dye, immediately after glucose addition, thus demonstrating a strong activity of dye efflux in this strain. When compound 3 was added before glucose addition, a concentration-dependent inhibition of efflux was observed, and a concentration of 125 μM of 3 completely abolished the transportation of dye (Fig 5). The same experiments were performed with all the four compounds, in the same range of concentrations, and the results are summarized in Fig 5B as a percentage of efflux inhibition relative to the compound's concentration. For each compound tested, including PAβN, efflux is inhibited in a dose-dependent manner. One can mention that compound 3 is the most efficient, which is consistent with the data obtained in the susceptibility assays described in Fig 2.

Recent studies have shown that the mode of action of PAβN includes not only efflux inhibition but also outer membrane destabilization [32, 33]. Considering that our compounds are polyamine derivatives and that polyamines are known to disrupt membranes [34], one cannot exclude that the inhibition of glucose-triggered efflux of the dye described in Fig 5 could result, at least in part, from the disruption of the outer membrane of *P. aeruginosa* and consequently



**Fig 4. Compound 3 activity against *P. aeruginosa* strains over-expressing efflux pumps.** The ability of bacteria to grow under various conditions was assessed in solid media containing, in a: 2 mg/L doxycycline (left) or a combination of 2 mg/L doxycycline and 10 μM compound 3 (right) and in b: 4 mg/L chloramphenicol (left) or a combination of 4 mg/L chloramphenicol and 10 μM compound 3 (right). 5 μL of logarithmic dilutions of an overnight culture of each strain were spotted on the plates. From top to bottom, PA01, PT629, PA01-ERY<sup>R</sup>, PA0-7H, CMZ091 and FB1.

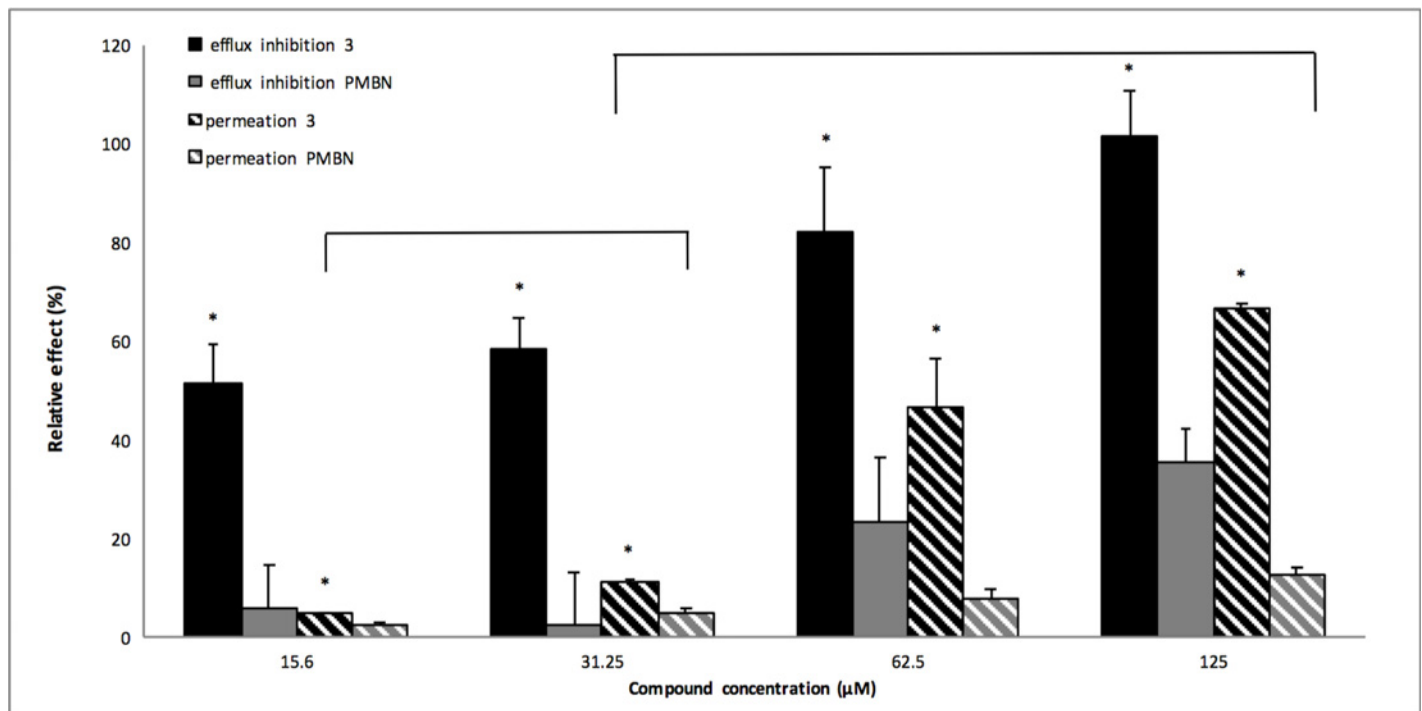
doi:10.1371/journal.pone.0154490.g004



**Fig 5. Inhibition of the efflux of the 1,2'-dinaphthylamine dye by the compound 3.** Efflux was triggered after 200 s by the addition of 50 mM glucose (arrow). The intensity of fluorescence emission for 1,2'-dinaphthylamine is given in relative fluorescence units (RFU). (a) Concentration-dependent inhibition of 1,2'-dinaphthylamine efflux by compound 3 after glucose addition (arrow). Compound concentration ( $\mu\text{M}$ ) is indicated in front of each green curve; as a control, an experiment without addition of compound and glucose (-glc, red curve) was also included; (b) percent of efflux inhibition obtained for each compound and PABN as indicated. Error bars represent standard deviations of 2 independent experiments. \* indicates statistically significant difference in values ( $p < 0.05$ ) compared to PABN.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.g005

from the destabilization of the interactions between the partners of the RND complex that were shown necessary to ensure transport *in vitro* [35]. To evaluate the potential ability of 3 to permeabilize the outer membrane, we monitored the hydrolysis rate of the chromogenic  $\beta$ -lactam, nitrocefin, by the cells of *P. aeruginosa* PA01. The polymyxin-B derivative PMBN was previously described as having a strong permeation activity on the outer membrane of Gram-negative bacteria [24]. Therefore, we compared 3 with PMBN in permeation and efflux inhibition assays. We observed (Fig 6), that the permeation efficacy of 3 at 15.6  $\mu\text{M}$  was significantly



**Fig 6. Membrane permeation assays.** The effect on the PAO1 strain of compound **3** (black-filled and black-hatched bars) and PMBN (grey-filled and grey-hatched bars) were compared at concentrations ranging from 15.6 μM to 125 μM, as indicated. The relative effect corresponds either to efflux inhibition (filled-bars) or to outer-membrane permeation (hatched-bars). Error bars represent standard deviations of 2 independent experiments. \* indicates statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) differences of relative effect (efflux inhibition/outer membrane permeation) for compound **3** treatment compared to the respective PMBN treatment. Brackets indicate statistically comparable permeation effects.

doi:10.1371/journal.pone.0154490.g006

identical to 31.25 μM of PMBN (as indicated with bracket on Fig 6;  $p$  value  $\leq 0.05$ ). At the same concentrations, **3** already showed a fifty percent efflux inhibition, while PMBN was quite inefficient. The same analysis can be drawn for the respective concentrations of 31.25 μM of compound **3** and 125 μM of PMBN. In this case one can observe a 10 percent permeation activity for both, and a 60 percent efflux inhibition for **3** compared to 30 percent for PMBN (Fig 6). In addition, we investigated the activity of **3** on PAO1 using a fluorescence assay that monitors cytoplasmic membrane depolarization [36]. The compound **3** dissipated the proton motive force (S3 Fig). This result may explain the antagonism of **3** with the aminoglycoside antibiotic amikacin (S3 Table), which requires the component of the transmembrane electrochemical gradient for cell penetration [28].

## Discussion

Here, we describe the study of new chemosensitizers that are able to increase the susceptibility to doxycycline of intrinsically resistant *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* is one of the most prevalent human pathogens and is known to be difficult to eradicate using the current therapeutic strategies. This is due to its natural antibiotic resistance and its strong ability to acquire additional mechanisms of resistance. In the present study, we aimed to identify a combination drug and new molecule that could be effective on both wild type and clinical strains. We used doxycycline as the antibiotic of choice because it is not used as a human therapeutic to treat infections with *P. aeruginosa* due to its low susceptibility. A preliminary study had previously demonstrated that polyamino-geranic compounds, in combination with doxycycline, were able to restore susceptibility of *Enterobacteriaceae* to antibiotics [17].



A prerequisite screening of original molecules was performed in a high-content procedure on the reference strain PA01 using a 10  $\mu\text{M}$  concentration of our bioactive compounds [36] and a concentration of 4 mg/L of doxycycline. Although several compounds showed activity by decreasing bacterial growth in combination with doxycycline, we focused our studies on compound 3, which completely abolished bacterial growth. Using the checkerboard assay, the FIC index of the compound 3-doxycycline combination was determined to be 0.09, demonstrating a strong synergy between the molecules. Additionally, we observed that derivative 3 strongly decreased the resistance of MDR strains to both doxycycline and chloramphenicol, which belong to different antibiotic families. This observation suggests that this polyamino-isoprenic molecule may directly impair the natural resistance mechanisms of *P. aeruginosa*. This compound is a polyamino-farnesyl molecule and possesses a tri-isoprenyl group that could help the molecule pass through the outer membrane of *P. aeruginosa*, which is known to be strongly impermeable due to the presence of a highly hydrophobic lipid bilayer, in addition to a positively charged spermine moiety that could interact with the negatively charged outer membrane of the bacteria. In comparison with PA $\beta$ N, the most studied chemosensitizer of *P. aeruginosa* toward antibiotics [30], compound 3 appeared to be approximately 10 times more potent (Fig 2). Interestingly, the same type of assay performed against *Enterobacteriaceae* identified not derivative 3 but compound 2 as the most potent (data not shown). These two compounds differ in both the size of the isoprenyl moiety and the structure of the involved amino group (Fig 1). Taking into consideration the LogD parameter, which reflects the true behavior and bioavailability of an ionizable compound in a solution at a given pH, a significant correlation with anti-pseudomonal activity was observed. Indeed, derivative 3 displaying the highest LogD values (e.g., the most hydrophobic derivative) also possesses higher activity than compounds 1, 2, 4. Moreover, it clearly appears (S2 Fig) that derivative 3 is ionized as tri or tetra protonated species at a physiological pH enhancing its ability to interact with the negative charges present at the surface of the outer membrane of bacteria.

When tested in association with doxycycline against a series of clinical isolates, the high potency of derivative 3 was confirmed, with all of the clinical isolates being killed.

To determine the cytotoxicity of these compounds, they were tested on Chinese hamster ovary (CHO) cells and exhibited an IC<sub>50</sub> of over 100  $\mu\text{M}$ , which is at least 10 times the concentration used in this study (Table 2). However, we also observed a higher toxicity for human fibroblasts of compounds 1 and 4. Consequently, we cannot exclude the same increase for compounds 2 and 3. In addition, in all of the assays performed, we observed that the compounds are less cytotoxic than the control molecule doxorubicin.

To better understand the mode of action of compounds, we performed real-time efflux assays. We observed a dose response effect for each compound, with compound 3 being the most efficient at inhibiting the 1,2'-DNA efflux (Figs 5 and 6). As described in Fig 5, a relatively high concentration of 3 (31.25  $\mu\text{M}$ ) is needed to inhibit 50% of 1,2'DNA efflux. This might result from the setting up of a real-time assay that requires a high number of bacteria ( $2.5 \times 10^8$  cfu/mL) compared to MIC determination ( $5 \times 10^5$  cfu/mL) combined to an immediate observable effect. This compound was further assayed for its ability to permeabilize the outer membrane of *P. aeruginosa*. Compared to PMBN, compound 3 partially destabilizes the outer membrane, and strongly inhibits efflux pumps, (Fig 6). Taken together, these data strongly suggested that although 3 destabilizes the outer membrane, this effect cannot completely explain the efflux inhibition observed. In addition, we observed that 3 induced a significant depolarization of the inner membrane of PA01 (S3 Table). Taken together, according to the proton gradient dependence of the RND-efflux pumps, these data suggest that 3 inhibits efflux in *P. aeruginosa* by depleting the energy of the pumps.

Nowadays, there is no doubt that the emergence and the dissemination of bacterial resistance towards a drug is directly related to its rate of use [37]. The continuous development of drug resistance mechanisms linked to drug usage is also exemplified by the observed decrease in chloramphenicol resistance in countries where its use is strongly controlled [38]. Here, we have determined that an association between doxycycline and a polyamino-isoprenic compound killed *P. aeruginosa* reference strain, efflux overproducers and clinical isolates. To our knowledge, it is the first report of such an activity and may open a new field of investigation, associating pharmaco-chemistry and microbiology to develop molecules with better efficiency on bacteria and decreased toxicity. Since it is necessary to continuously develop alternate solutions to circumvent bacterial adaptation and due to the paucity of new drugs in the pharmaceutical company pipelines [39], our strategy could constitute an opportunity for neglected molecules to be rejuvenated by using “escort molecules” to improve their action. Our study paves the way for this type of new original antibacterial strategies.

## Supporting Information

**S1 Fig. Results of the screening procedure.** (\*) the compounds NV730, NV731, NV716 and NV720 are the compounds 1, 2, 3, 4 selected in this study respectively. (\*\*) The concentration of 10  $\mu\text{M}$  used in this study is over the MIC of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 for polymyxin-B.

(TIFF)

**S2 Fig. Determination of LogD and protonated species for derivative 3.** All LogD and protonated species involved for derivative 3 have been determined by using chemical simulation software Marvin Sketch 5.11.3.

(PDF)

**S3 Fig. Inner membrane depolarization by 3.** The membrane potential disruption was followed by monitoring Disc<sub>3</sub>(5) fluorescence.

(PDF)

**S1 Table. Description of the clinical isolates.** The antibiotic resistance of each isolate for commonly used antibiotics and the MIC for doxycycline are indicated.

(PDF)

**S2 Table. Results of the checkerboard assay.** For each concentration of the combination between, (a) doxycycline and compound 3; (b) doxycycline and PA $\beta$ N, the FIC index is indicated.

(PDF)

**S3 Table. Results of the synergy assays of compound 3 with representative anti-pseudomonal agents.**

(PDF)

## Acknowledgments

We are grateful to Professor Patrick Plésiat (Université de Franche-Comté, Besançon, France) for providing us with strains and for helpful and stimulating discussions. We acknowledge M. deMéo and C. diGiorgio from the laboratory of biogenotoxicology and environmental mutagenesis (school of Pharmacy, Marseille) for their contribution to the cytotoxicity assays, and Dr. V. Mejean (Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des protéines, Marseille, France) for reading the manuscript and providing suggestions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: J. Bolla J. Brunel EG. Performed the experiments: DB AL HT. Analyzed the data: J. Bolla J. Brunel JMP EG DB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EG J. Bolla J. Brunel JMP. Wrote the paper: DB J. Bolla J. Brunel.

## References

- Xu Z-Q, Flavin MT, Flavin J. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014; 23(2): 163–82. doi: [10.1517/13543784.2014.848853](https://doi.org/10.1517/13543784.2014.848853) PMID: [24215473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24215473/)
- Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 15(10): 1351–70. doi: [10.1517/14656566.2014.914172](https://doi.org/10.1517/14656566.2014.914172) PMID: [24766095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24766095/)
- Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013; 12(1): 22. doi: [10.1186/1476-0711-12-22](https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-22)
- Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(6–7): 287–92. doi: [10.1016/j.ijmm.2013.02.009](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009) PMID: [23499305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23499305/)
- Davin-Regli A, Bolla J-M, James CE, Lavigne J-P, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug “influx and efflux” in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(9): 750–9. PMID: [18781921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18781921/)
- Schweizer HP. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2012; 7(7): 633–42. doi: [10.1517/17460441.2012.688949](https://doi.org/10.1517/17460441.2012.688949) PMID: [22607346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22607346/)
- Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Micro*. 2008; 6(12): 893–903.
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol* 2014; 4. doi: [10.3389/fmicb.2013.00422](https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422)
- Mamelli L, Petit S, Chevalier J, Giglione C, Lieutaud A, Meinnel T, et al. New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors. *PLoS ONE*. 2009; 4(7): e6443. doi: [10.1371/journal.pone.0006443](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006443) PMID: [19649280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19649280/)
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5): 634–40. PMID: [11823954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11823954/)
- Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(8): 2696–9. PMID: [12121960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12121960/)
- Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2012; 3: 408. doi: [10.3389/fmicb.2012.00408](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00408) PMID: [23233851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23233851/)
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(12): 3322–7. PMID: [11083635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11083635/)
- Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo J-D, Plésiat P. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(4): 1582–3. PMID: [17220417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17220417/)
- Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39(9): 1948–53. PMID: [8540696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8540696/)
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(9): 2242–6. PMID: [10952562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10952562/)
- Brunel JM, Lieutaud A, Lome V, Pagès J-M, Bolla J-M. Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem*. 2013; 21(5): 1174–1179. doi: [10.1016/j.bmc.2012.12.030](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.12.030) PMID: [23352753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352753/)
- Bolla J-M, Brunel JM, Casanova JPF, Lorenzi V, Berti L. Preparation of polyaminoisoprenyl derivatives for use in medical and nonmedical antibiotic or antiseptic treatment. *PCT Int Appl*. 2012; (WO2012/113891A1):51pp.
- Lieutaud A, Guinoiseau E, Lorenzi V, Guilliani M, Lome V, Brunel J, et al. Inhibitors of antibiotic efflux by AcrAB-TolC in *Enterobacter aerogenes*. *Anti-Infective Agents*. 2013; 11(2): 168–178.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*; 2000; 406(6799): 959–64. PMID: [10984043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10984043/)

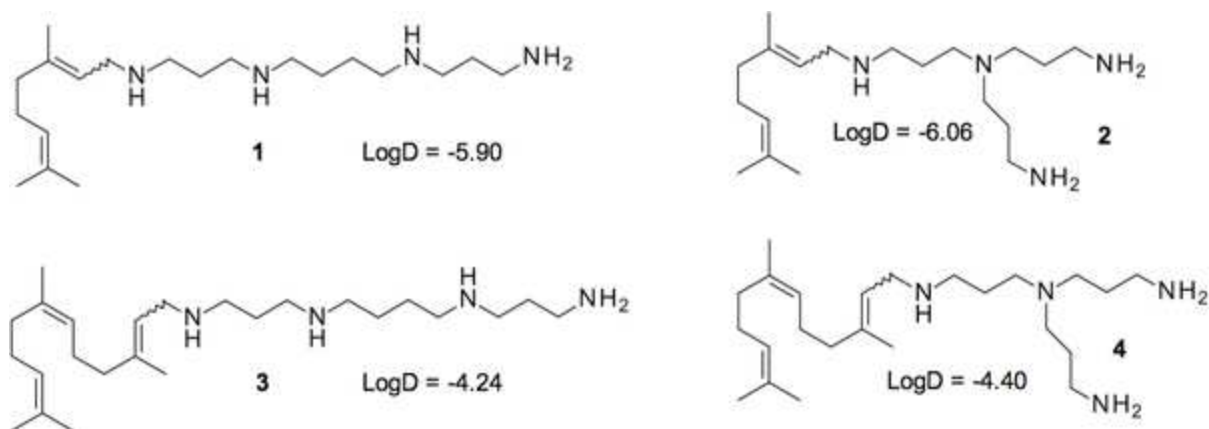


21. Dumas J-L, van Delden C, Perron K, Köhler T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 254(2): 217–25. PMID: [16445748](#)
22. Hamzehpour MM, Pechere J-C, Plésiat P, Köhler T. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(11): 2392–6. PMID: [8585714](#)
23. Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1997; 23(2): 345–54. PMID: [9044268](#)
24. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(3): 1211–21. doi: [10.1128/AAC.01252-10](#) PMID: [21149619](#)
25. Vettoretti L, Plésiat P, Muller C, Garch El F, Phan G, Attrée I, et al. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(5): 1987–97. doi: [10.1128/AAC.01024-08](#) PMID: [19258280](#)
26. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(1): 1. PMID: [12805255](#)
27. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclusines. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(2): 256–65. PMID: [16816396](#)
28. Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev.* 1987; 51(4): 439–57. PMID: [3325794](#)
29. Renau TE, Léger R, Filonova L, Flamme EM, Wang M, Yen R, et al. Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2003; 13(16): 2755–8.
30. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(1): 105–16. PMID: [11120952](#)
31. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011; 2: 65. doi: [10.3389/fmicb.2011.00065](#) PMID: [21747788](#)
32. Iino R, Nishino K, Noji H, Yamaguchi A, Matsumoto Y. A Microfluidic Device for Simple and Rapid Evaluation of Multidrug Efflux Pump Inhibitors. *Front Microbiol.* 2012; 3. doi: [10.3389/fmicb.2012.00040](#)
33. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA $\beta$ N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS ONE.* 2012; 8(3): e60666–6.
34. Kwon DH, Lu CD. Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(5): 1623–7. PMID: [16641427](#)
35. Verchère A, Broutin I, Picard M. Photo-induced proton gradients for the in vitro investigation of bacterial efflux pumps. *Sci Rep.* 2012; 2. doi: [10.1038/srep00306](#)
36. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol.* 2011; 7(6): 348–50. doi: [10.1038/nchembio.559](#) PMID: [21516114](#)
37. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 13. doi: [10.1186/1471-2334-14-13](#) PMID: [24405683](#)
38. Nitzan O, Suponitzky U, Kennes Y, Chazan B, Raul R, Colodner R. Is chloramphenicol Making a comeback? *Isr Med Assoc J.* 2010; 12(6): 371–4. PMID: [20928993](#)
39. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot.* 2013; 66(10): 571–91. doi: [10.1038/ja.2013.86](#) PMID: [24002361](#)

## DISCUSSION ARTICLE 2 :

*P. aeruginosa* est un des pathogènes les plus problématiques en médecine humaine, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose. Il présente un haut niveau de résistance intrinsèque et acquise ce qui restreint grandement les possibilités de traitement. Le but de l'étude était de combiner un ATB qui ne peut actuellement pas être utilisé en thérapeutique anti-pyocyanique, avec une molécule chimio-sensibilisante qui pourrait être efficace à la fois sur la souche sauvage mais également sur des isolats cliniques. Dans cette étude nous avons décrit l'utilisation de dérivés polyamino-isopréniques comme adjuvant d'ATBs. Ces dérivés sont capables de restaurer la sensibilité à la doxycycline de *P. aeruginosa* en agissant directement sur la résistance intrinsèque de la bactérie.

Le criblage m'a permis de sélectionner 4 molécules adjuvantes, parmi lesquelles le composé **3** inhibait totalement la croissance bactérienne en présence de l'ATB, à la fois de la souche sauvage mais également de tous les isolats cliniques multirésistants considérés dans l'étude. Ces résultats démontrent que l'efficacité du composé **3** est indépendante de tout mécanisme de résistance acquis.



Ensuite j'ai pu, en réalisant un test de l'échiquier, déterminer que l'interaction entre la doxycycline et le composé **3** était fortement synergique avec un FIC index de 0,09, à l'image de la combinaison doxycycline / PAβN. Cependant, le composé **3** permet de restaurer la sensibilité de la souche sauvage PA01 avec des concentrations nettement inférieures (environ dix fois inférieures). Afin de s'assurer que l'effet synergique observée avec la doxycycline n'était pas dû à des interactions spécifiques j'ai également

étudier la capacité du composé **3** à potentialiser un ATB appartenant à une famille différente et vis-à-vis duquel *P. aeruginosa* présente également une résistance naturelle, le chloramphénicol. Ainsi j'ai mis en évidence la capacité du composé **3** à potentialiser l'activité de la doxycycline et du chloramphénicol sur des mutants surproducteurs des principales pompes d'efflux. Ces résultats démontrent que ce dérivé polyamino-isoprénique est capable d'altérer la résistance naturelle de *P. aeruginosa*. Lorsque l'on compare les LogD (paramètre permettant d'évaluer la propension d'un candidat médicament à traverser les membranes biologiques) des composés, l'on observe que le composé **3** possède le LogD le plus élevé des quatre. De plus, à pH physiologique le composé **3** peut être tri ou tétraprotonné au niveau de sa chaîne spermine ce qui augmente d'autant plus ses interactions avec les charges négatives du LPS. Nous avons donc émis l'hypothèse que la structure tri-terpénique du composé **3** favorise grandement le passage à travers la membrane de *P. aeruginosa*. Par ailleurs, les polyamines étant reconnues comme pouvant provoquer une déstabilisation de la membrane, nous avons mesuré l'effet membranotrope du dérivé **3** par un test d'hydrolyse de la nitrocéfine. A l'inverse de la PMBN qui est un perméabilisant de la membrane externe, le composé **3** déstabilise la membrane dans une moindre mesure mais inhibe fortement l'efflux. En effet, les mesures d'efflux en temps réel ont mis en évidence la capacité des composés à bloquer le transport du 1,2 DNA. Ce composé est un fluorochrome présentant plusieurs propriétés nous permettant de l'utiliser comme traceur de l'efflux. En effet il possède une forte affinité pour les membranes dans lesquelles il est fluorescent et est substrat des pompes d'efflux. Une diminution de la fluorescence est donc associée à un efflux actif alors qu'une conservation du niveau de la fluorescence initiale traduit une inhibition des systèmes d'efflux. L'ensemble de ces résultats montrent que seule une action membranotrope ne peut expliquer l'inhibition de l'efflux causée par le composé **3**. Par ailleurs, la dépolarisation membranaire provoquée par le composé **3** suggère fortement que le composé **3** exerce son activité adjuvante par une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATB causée par un blocage des pompes d'efflux. Cette inhibition de l'efflux serait la résultante d'une action membranotrope conduisant à une dépolarisation membranaire suffisante pour collapser la force proton-motrice.

Enfin, nous avons également évalué la cytotoxicité des composés sélectionnés sur des cellules issues d'ovaires d'hamster chinois (CHO) dont l'IC<sub>50</sub> est supérieur à 100  $\mu$ M, ce qui représente 10 fois la concentration utilisée dans l'étude. Cependant une

toxicité plus importante a été observée sur les cellules de fibroblastes humains pour les composés **1** et **4**, donc nous ne pouvons pas exclure que des résultats similaires puissent être observés avec les composés **2** et **3**.

Dans cette étude nous avons apporté la preuve de concept qu'une thérapie combinatoire entre des dérivés polyamino-isopréniques et un ATB comme la doxycycline puisse être envisagée pour élargir l'arsenal thérapeutique existant contre des pathogènes hautement résistants tel que *P. aeruginosa*. En effet, cette stratégie permet grâce à des molécules adjuvantes, sans aucune activité antibactérienne intrinsèque, d'offrir une seconde vie aux anciennes molécules ATBs, et ainsi d'apporter des solutions malgré le faible renouveau en agents antimicrobiens.

### ARTICLE 3 :

#### **Motuporamine derivatives as antimicrobial agents and antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria.** Diane Borselli,

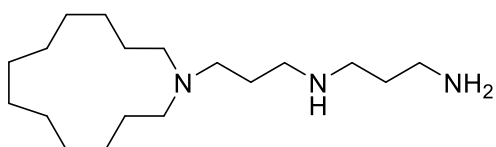
Marine Blanchet, Jean-Michel Bolla, Aaron Muth, Kristen Skruber, Otto Phanstiel, Jean Michel Brunel sous presse dans le journal *Chem Bio Chem*.

Afin d'adresser la problématique de l'antibiorésistance et particulièrement l'émergence de bactéries Gram négatives multirésistantes, voire résistantes à toutes les classes d'ATB (361) tels que *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* il est impératif de proposer de nouvelles stratégies de traitement. Dans ce contexte, le développement de nouvelles molécules, notamment de chimiosensibilisants permettant d'augmenter la concentration intracellulaire d'ATBs est très intéressant.

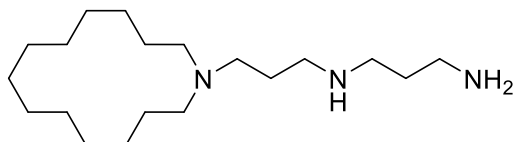
De précédentes études ont supposé que les peptides cationiques (362) et les polyamines (363) pouvaient, à l'image des cations divalents, interagir avec les charges négatives du lipide A et ainsi augmenter la perméabilité membranaire. Dans ce contexte, nous avons choisi d'utiliser des dérivés polyaminés hydrophobes supposés déstabiliser fortement les membranes bactériennes. Les dérivés motuporamines initialement isolés de l'éponge marine *Xestospongia exigua* (364), ont été considérées dans l'étude pour leur caractère amphiphile. En effet, ces molécules possèdent un macrocycle lié à une chaîne polyamine. La dihydromotuporamine C (composé **4a**, **MOTU-33**) s'est avéré très intéressante d'un point de vue biologique par son activité cytotoxique vis-à-vis de cellules du cancer du sein mais également anti-invasive (364), (365). Plus tard, une série de motuporamines (composés **4-6**) et de dérivés de type polyamine anthracéniques similaires (composés **7a-d**) ont été synthétisés par *Muth et al* (357), (366) et leur activité biologique concernant leurs propriétés anti-invasives et anti-métastatiques ont été évaluées (357). L'étude a ainsi permis de mettre en évidence que le degré d'insaturation du noyau anthracényle modifiait drastiquement l'activité biologique ainsi que la cytotoxicité ce qui nous a encouragé à tester cette série chimique.

Précédemment, nous avons pu voir que les polyamines possédaient des propriétés antibactériennes intéressantes aussi, nous avons voulu évalué le potentiel antibactérien et chimio-sensibilisant de cette nouvelle famille de polyamines. Dans cette étude nous avons évalué l'activité microbiologique de ces composés en tant qu'adjuvant d'ATBs

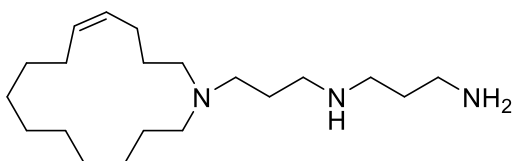
sur des bactéries Gram négatives. Dans un deuxième temps nous avons également étudié le mode d'action du composé présentant le meilleur profil, **MOTU-N44**, sur un l'isolat multirésistant d'*E. aerogenes*.



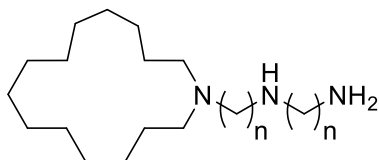
**1:** Motuporamine A



**2:** Motuporamine B

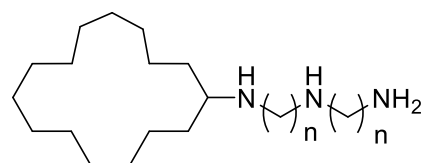


**3:** Motuporamine C



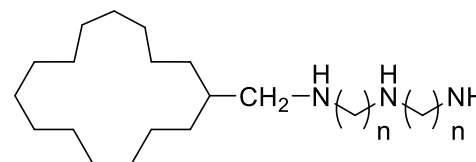
**4a:** n=3 (**Motu33**)

**4b:** n=4 (**Motu44**)



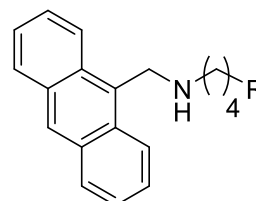
**5a:** n=3; 3 HCl (**MotuN33**)

**5b:** n=4; 3 HCl (**MotuN44**)



**6a:** n=3; 3 HCl (**MotuCH<sub>2</sub>33**)

**6b:** n=4; 3 HCl (**MotuCH<sub>2</sub>44**)



**7a:** R=H (**Ant-N-butyl**)

**7b:** R=NH<sub>2</sub> (**Ant4**)

**7c:** R=NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> (**Ant44**)

**7d:** R=NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> (**Ant44**)

# Motuporamine Derivatives as Antimicrobial Agents and Antibiotic Enhancers against Resistant Gram-Negative Bacteria

Diane Borselli,<sup>[a]</sup> Marine Blanchet,<sup>[b]</sup> Jean-Michel Bolla,<sup>[a]</sup> Aaron Muth,<sup>[c]</sup> Kristen Skruber,<sup>[c]</sup> Otto Phanstiel IV,<sup>\*,[c]</sup> and Jean Michel Brunel<sup>\*,[b]</sup>

Dihydromotuporamine C and its derivatives were evaluated for their in vitro antimicrobial activities and antibiotic enhancement properties against Gram-negative bacteria and clinical isolates. The mechanism of action of one of these derivatives, MOTU-N44, was investigated against *Enterobacter aerogenes* by using fluorescent dyes to evaluate outer-membrane depolarization and permeabilization.

Its efficiency correlated with inhibition of dye transport, thus suggesting that these molecules inhibit drug transporters by de-energization of the efflux pump rather than by direct interaction of the molecule with the pump. This suggests that depowering the efflux pump provides another strategy to address antibiotic resistance.

## Introduction

Antimicrobial resistance threatens the prevention and treatment of an ever-increasing range of infections caused by bacteria, parasites, viruses, and fungi. An increasing number of governments around the world are devoting efforts to this problem, which is so serious that it threatens the achievements of modern medicine. Far from being an apocalyptic fantasy, a post-antibiotic era in which common infections and minor injuries can kill is a real possibility for the 21st century. A recent WHO report makes a clear case that resistance to common bacteria has reached alarming levels in many parts of the world, and that in some settings few, if any, of the available treatment options remain effective for common infections. Another important finding of the report is that surveillance of antibacterial resistance is neither coordinated nor harmonized and there are many gaps in information regarding bacteria of major public health importance.<sup>[1]</sup>

The intensive use of antibiotics for the treatment of numerous bacterial infections is one of the biggest healthcare advan-

ces in modern times. Nevertheless, their widespread use has led to an increasing number of antibiotic-resistant bacteria.<sup>[2]</sup> In particular, the emergence of Gram-negative multidrug-resistant (MDR) bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, has prompted efforts to develop new classes of antibiotics and chemosensitizers (molecules to promote an increase in the internal antibiotic concentration in resistant strains). Thus, diseases caused by MDR Gram-negative bacteria are increasing worldwide,<sup>[3,4]</sup> and the emergence of pan drug-resistant (PDR) bacteria (resistant to all classes of antibiotics and to quaternary ammonium disinfectants)<sup>[5]</sup> appears to have reached a point of no return.<sup>[6,7]</sup> We have noticed great concern in the medical community, as numerous recent clinical reports have confirmed that Gram-negative bacteria have developed resistance to polymyxins, the last efficient therapy against PDR Gram-negative bacteria.<sup>[8–10]</sup>

An appealing target is the unique structure of the bacterial membrane, which is highly conserved among most species of Gram-negative bacteria, and forms an effective barrier to many types of antibiotics.<sup>[11]</sup> Indeed, the acquisition of resistance to membrane-active antibiotics has likely required major changes in membrane structure. Ironically, modifications to the bacterial membrane to escape membrane-targeting antibiotics might increase the permeability of the barrier and actually increase the susceptibility of the bacteria to hydrophobic antibiotics.

It is well established that most immune responses to Gram-negative bacteria involve recognition of lipopolysaccharides (LPS) and their lipid A anchors, which constitute the major components of the outer membrane.<sup>[12–17]</sup> The permeability barrier of the outer membrane is due to the cross-bridging electrostatic interactions between lipid A molecules and divalent cations such as calcium or magnesium.<sup>[12]</sup> We speculated that cationic peptides<sup>[18]</sup> and polyamines<sup>[19]</sup> could out-compete these divalent cations for their membrane binding sites and disrupt the outer membrane organization, thereby increasing

[a] D. Borselli, J.-M. Bolla  
Aix-Marseille Université, IRBA  
TMCD2 UMR-MD1, Faculté de Médecine  
27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05 (France)

[b] M. Blanchet, Dr. J. M. Brunel  
Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM)  
CNRS, UMR7258, Institut Paoli Calmettes  
Aix-Marseille Université, UM 105, Inserm, U1068  
27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05 (France)  
E-mail: bruneljm@yahoo.fr

[c] A. Muth, K. Skruber, Dr. O. Phanstiel IV  
Department of Medical Education, University of Central Florida  
12722 Research Parkway, Orlando, FL 32826-3227 (USA)  
E-mail: otto.phanstiel@ucf.edu

© 2017 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

permeability. Because of the promising applications of polyamine derivatives in medicine,<sup>[20–22]</sup> we evaluated a series of hydrophobic polyamine derivatives for their ability to target the membrane stability of Gram-negative bacteria and increase the sensitivity of these bacteria to known antibiotics.

The motuporamines (originally isolated from the marine sponge *Xestospongia exigua*)<sup>[23]</sup> were selected because their amphiphilic architectures comprise a large hydrophobic macrocycle with an appended polyamine motif (1–3, Scheme 1). A series of motuporamine derivatives (4–6) was prepared<sup>[24,25]</sup> along with a series of related anthracenyl-polyamine derivatives (7a–d). These amphiphilic polyamines have large hydrophobic substituents to facilitate interaction with the bacterial membrane.

Here, 4–6 and 7a–d were screened for their in vitro antimicrobial activities and antibiotic-enhancement properties against resistant Gram-negative bacteria. We also explored the mechanism of action of this class of derivatives against *Enterobacter aerogenes* (EA289) by using fluorescent dyes, in order to evaluate changes in outer-membrane depolarization and permeabilization.

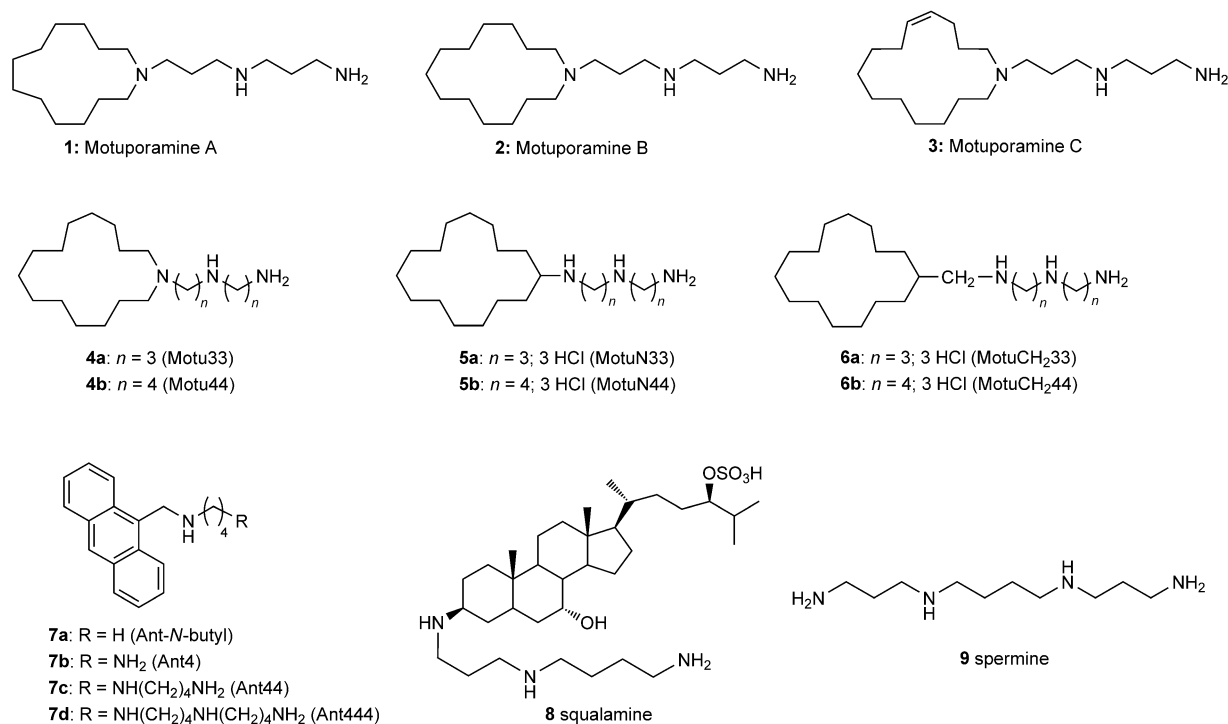
## Results and Discussion

Our investigations began with the determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs) of 4–7 in Gram-positive and -negative species, in order to identify the concentrations that produce a direct antibacterial effect and allowed us to rank their relative potencies. We included two Gram-negative bacteria encountered in hospitals, *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*, and multidrug-resistant *E. aerogenes* EA289

(Table 1). Several compounds showed MICs of 100–200  $\mu\text{M}$  for these bacterial strains. The anthracenyl compounds 7a–d had relatively weak antimicrobial activities, whereas their related motuporamine derivatives 4a–b, 5a–b, and 6a–b showed MICs of 1.56–50  $\mu\text{M}$ . Specifically, 6a (MOTU-CH<sub>2</sub>-33) and 6b (MOTU-CH<sub>2</sub>-44) exhibited excellent antimicrobial activities against many species, including the multidrug-resistant *E. aerogenes* EA289.

As stated previously, the development of chemo-sensitizing agents, which enhance the intracellular antibiotic concentration in resistant strains (or by other mechanisms) is an attractive approach to overcome bacterial resistance. Thus, we investigated the use of these polyamine derivatives as adjuvants in combination with antibiotics. Success here would provide an exciting approach to increase the potency of current antibacterial drugs, even for strains that have developed resistance.

We investigated whether these polyamine agents could restore the potency of the antibiotic doxycycline at significantly below its MIC. For example, in our hands the MIC of doxycycline against *P. aeruginosa* PAO1 was 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , so we investigated the use of doxycycline at a significantly lower concentration (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , corresponding to its pharmacokinetic properties in humans)<sup>[6]</sup> in the presence of the polyamine derivatives. We speculated that the polyamine agents would disrupt bacterial membrane integrity and increase antibiotic delivery to the bacteria and thus increase doxycycline potency. Rewardingly, even at this low doxycycline concentration, eight of the polyamine derivatives restored doxycycline activity against *E. aerogenes* EA289, *P. aeruginosa* PAO1, and *K. pneumoniae* KPC2-ST258; no improvement was observed for 7b (ANT4) or 7a (ANT-N-butyl) even at 40  $\mu\text{M}$  (Table 2). The fact that this effect



Scheme 1. Motuporamine compounds 1–6, anthracenyl compounds 1–7, squalamine 8, and spermine 9.



**Table 1.** MIC of motuporamine derivatives against various bacterial strains.

Compound	MIC [ $\mu\text{M}$ ]						
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. intermedius</i> 1051997	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>E. coli</i> ATCC28922	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>E. aerogenes</i> EA289	<i>K. pneumoniae</i> KPC2-ST258
<b>7b</b> , ANT4	> 200	200	> 200	200	200	100	100
<b>7c</b> , ANT44	50	200	> 200	50	100	200	> 200
<b>7d</b> , ANT444	12.5	25	200	25	100	100	100
<b>7a</b> , ANT-N-butyl	> 200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<b>6a</b> , MOTU-CH <sub>2</sub> -33	1.56	3.125	3.125	1.56	6.25	50	100
<b>5a</b> , MOTU-N33	3.125	1.56	12.5	3.125	12.5	100	100
<b>6b</b> , MOTU-CH <sub>2</sub> -44	1.56	1.56	3.125	1.56	12.5	50	100
<b>4b</b> , MOTU44	100	50	> 200	100	100	50	100
<b>4a</b> , MOTU33	50	50	100	50	50	100	100
<b>5b</b> , MOTU-N44	1.56	1.56	6.25	6.25	25	50	50

was compound-specific was intriguing and ruled out a non-specific detergent effect, especially because no cell lysis was observed.

Several of the effective compounds also acted synergistically with chloramphenicol and erythromycin, particularly against PAO1, but weakly against EA289 and KPC2-ST258 (Table 3). Thus, we identified two groups of compounds: one (**7a** and **7b**) displayed weak or no activity, and the second (e.g., **5a** and **5b**) increased the antibiotic susceptibility effectively against PAO1. Overall, **5a** and **5b** appeared the most promising adjuvants for use with doxycycline; **5b** (MOTU-N44) was chosen to investigate the mechanism of action of this molecular class.

Within the motuporamine series (**4**–**6**) several compounds exhibited moderate to good antibacterial activity as well as potent synergy with different antibiotics against Gram-negative bacteria. We explored the mechanism of action of these compounds and focused on two possible pathways: permeabilization and/or disruption of the outer membrane, and inhibition of an efflux pump.

First, we determined the effect of **5b** on *Staphylococcus aureus* ATCC25923 by measuring ATP release for 1 min: there was dramatic disruption of the bacterial membrane, similar to that by squalamine (positive control; Figure 1).<sup>[26]</sup> Conversely, no significant effect was found for the polyamine spermine (negative control).

As we observed different compound performance in the assays with *S. aureus* in Table 1, we speculated that some of these molecules might achieve lethality by increasing the rate

**Table 2.** Concentration of motuporamine derivatives necessary to restore doxycycline activity ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) against EA289, PAO1 and KPC2 ST258 Gram-negative bacterial strains.

Compound	Concentration of motuporamine derivative [ $\mu\text{M}$ ]		
	EA289	PAO1	KPC2 ST258
<b>7c</b> , ANT44	10	5	5
<b>7d</b> , ANT444	1.25	2.5	1.25
<b>4a</b> , MOTU33	2.5	1.25	1.25
<b>4b</b> , MOTU44	1.25	2.5	1.25
<b>5a</b> , MOTU-N33	2.5	2.5	2.5
<b>5b</b> , MOTU-N44	5	1.25	2.5
<b>6a</b> , MOTU-CH <sub>2</sub> -33	5	5	2.5
<b>6b</b> , MOTU-CH <sub>2</sub> -44	2.5	2.5	1.25
<b>7b</b> , ANT4	40	> 40	40
<b>7a</b> , ANT-N-butyl	> 40	> 40	> 40

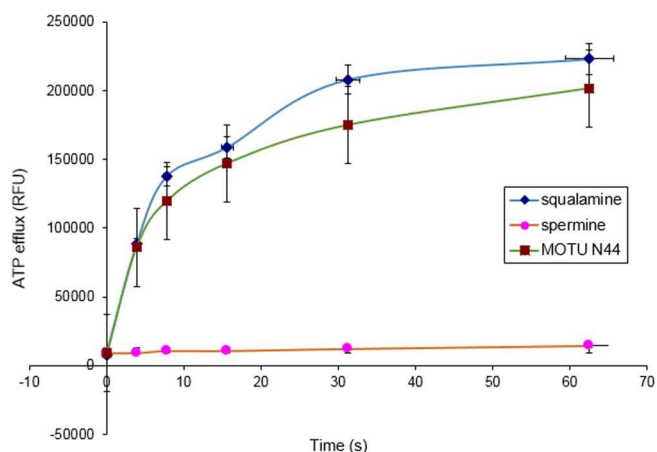
MICs of doxycycline against PAO1, EA289, KPC2ST258:  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $90 \mu\text{M}$ ),  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $45 \mu\text{M}$ ), and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $22.5 \mu\text{M}$ ), respectively.

of transport of molecules across the cytoplasmic membrane, whereas others might not. We surmised that compounds like **5b** might induce a smaller membrane breach, modestly affect the permeability barrier of the cytoplasmic membrane and cause membrane depolarization. Indeed, a small breach would allow the passage of electric current (thereby causing membrane depolarization) without allowing the passage of larger molecules. This alternative mechanism seemed plausible because depolarization would de-energize the efflux pump and also lead to increased potency of the antibiotic agent. Therefore, we investigated whether these molecules generated

**Table 3.** Concentration of the motuporamine derivative [ $\mu\text{M}$ ] required to restore chloramphenicol, erythromycin, and cefepime activity ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) against EA289, PAO1, and KPC2 ST258.

Compound	PAO1			EA289			KPC2 ST258		
	CHL	ERY	FEP	CHL	ERY	FEP	CHL	ERY	FEP
<b>4a</b> , MOTU33	5	20	n.t.	40	40	40	40	> 40	> 40
<b>4b</b> , MOTU44	5	40	n.t.	40	> 40	> 40	40	> 40	> 40
<b>5a</b> , MOTU-N33	2.5	10	n.t.	20	20	20	20	40	> 40
<b>5b</b> , MOTU-N44	5	> 40	n.t.	> 40	40	> 40	40	> 40	40
<b>6b</b> , MOTU-CH <sub>2</sub> -44	2.5	10	n.t.	20	20	> 40	20	> 40	> 40

CHL: chloramphenicol, ERY: erythromycin, FEP: cefepime, n.t.: not tested. MIC of FEP against PAO1:  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . All other antibiotic/strain combinations:  $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

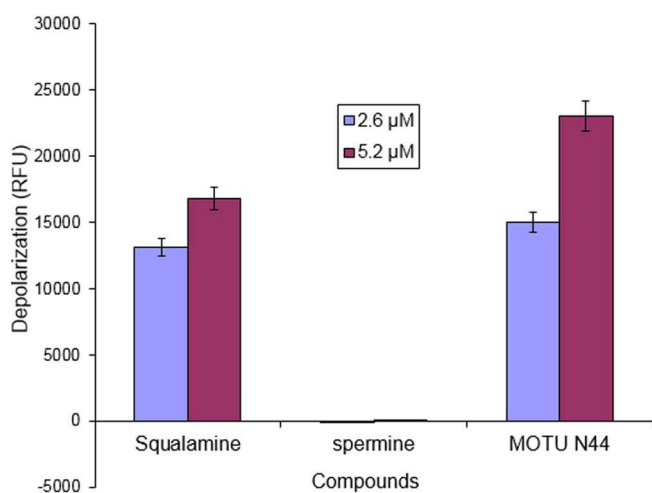


**Figure 1.** The effect of squalamine ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), spermine ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and **5b** (MOTU-N44,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) on ATP release kinetics for Gram-positive bacteria *S. aureus*.

a smaller breach of the permeability barrier of the cytoplasmic membrane.

Fluorescent cyanine dyes are excellent probes to monitor membrane depolarization. These dyes lose fluorescence intensity when in polarized membranes and become highly fluorescent once polarization is lost.<sup>[27]</sup> Thus, one can use changes in dye fluorescence to monitor change in membrane polarization. Interestingly, strong depolarization of *S. aureus* membranes was observed after 21 minutes as a strong increase in relative fluorescent units (RFU) of the cyanine dye (Figure 2) in the presence of **5b**. This suggests that **5b** facilitated membrane depolarization.

Next, **5b** was investigated for its ability to alter the cell outer membrane integrity of *E. aerogenes* EA289, by using nitrocefin, a chromogenic  $\beta$ -lactam that is efficiently hydrolyzed by periplasmic  $\beta$ -lactamases, thereby resulting in a significant color change from yellow to red.<sup>[28,29]</sup> Thus, colorimetric changes were used to monitor outer membrane integrity. Even



**Figure 2.** Depolarization of the bacterial membrane of *S. aureus* in the presence of 2.6 and 5.2  $\mu\text{M}$  squalamine, spermine, or **5b** (MOTU-N44).

at a low concentration (3.9  $\mu\text{M}$ ), **5b** increased the rate of nitrocefin hydrolysis compared to the spermine-treated or untreated control (Figure 3a). The behavior was similar to that of the positive control polymyxin-B (PMB) which also produced an increase in nitrocefin hydrolysis. All these data suggest that **5b** is able to permeabilize or disrupt the outer membrane of Gram-negative bacteria as no cell lysis was observed.

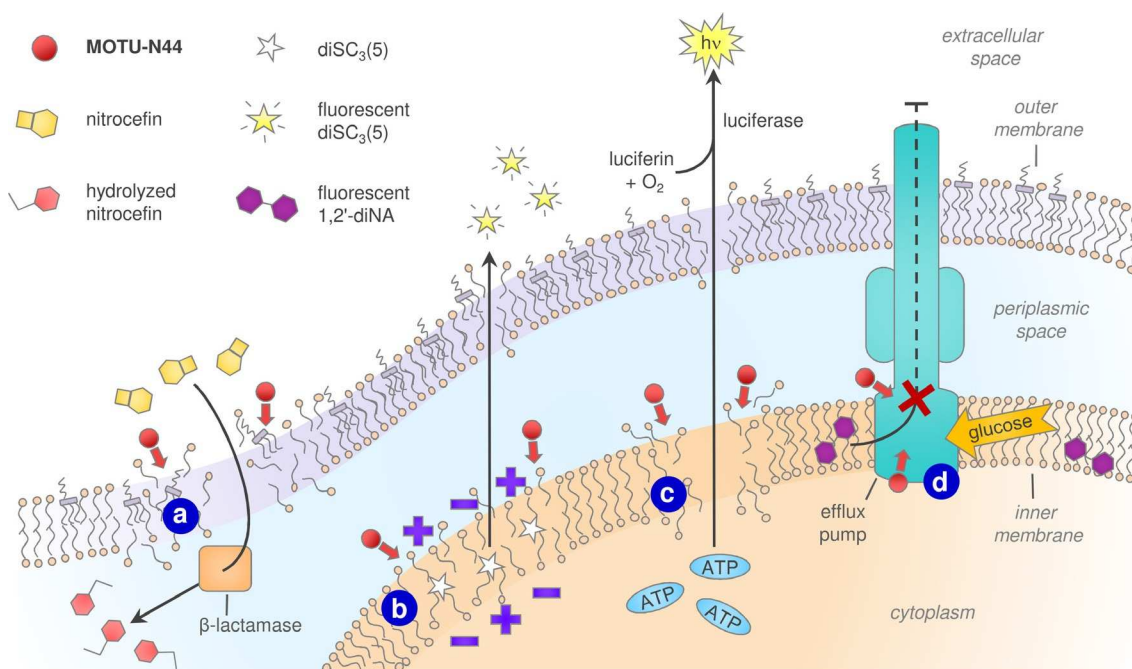
The drug-resistant bacterium EA289 overexpresses the AcrAB-TolC pump,<sup>[30]</sup> which belongs to the RND efflux pumps and uses the proton gradient across the inner membrane as an energy source. In order to determine if **5b** could act as a disruptor of the transmembrane potential, we used the membrane-potential-sensitive probe DiSC<sub>3</sub>(5) which concentrates at the inner membrane and self-quenches its fluorescence.<sup>[31]</sup> When a compound impairs the membrane potential, the dye is released into the growth medium thus leading to a fluorescence increase. Treatment with **5b** resulted in dose-dependent depolarization after 10 min of incubation (Figure 3b), thus suggesting disruption of the proton gradient and an ability to affect efflux pumps from the RND family such as AcrAB-TolC.

A similar outcome was observed when using a bioluminescence method to determine the release of intracellular ATP. Addition of **5b** caused dose-dependent permeabilization (Figure 3c). Interestingly, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  **5b** caused 11% ATP release into the medium after a few seconds, thus suggesting rapid disruption.

In general, efflux systems employ an energy-dependent mechanism (active transport) to pump out unwanted substances such as toxins, antibiotics, or dyes, through specific efflux pumps.<sup>[32]</sup> Some efflux systems are drug-specific, whereas others eject multiple drugs, and thus contribute to MDR. Efflux pumps are proteinaceous transporters in the cytoplasmic membrane of bacteria and are active transporters; thus they require a source of chemical energy. Some are primary active transporters that use ATP hydrolysis as a source of energy, whereas in others (secondary active transporters) transport is coupled to an electrochemical potential difference created by pumping protons or sodium ions from or to the outside of the cell. The transport of a known transport substrate can be used to directly monitor the function of efflux pumps, and **5b** was thus tested for its ability to inhibit efflux.

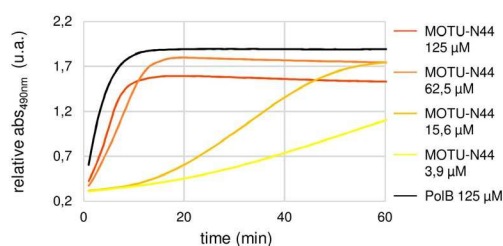
After loading EA289 bacteria with the dye 1,2'-dinaphthylamine (1,2'-diNA), which is a substrate of the AcrAB-TolC efflux pump,<sup>[33]</sup> the bacteria fluoresced. Bacteria were then incubated with and without **5b** at different concentrations before addition of glucose as an energy source. In the absence of **5b**, rapid active transport of more than 80% of the dye was observed (Figure 3d, black line). When **5b** was present, significant dose-dependent inhibition was observed (>80% retention at up to 25  $\mu\text{M}$  **5b**; Figure 3c, orange line). These results suggest that **5b** inhibits the AcrAB-TolC efflux pump.

A time-kill assay (Figure 4) and a cell viability assay (Figure 5) were performed in order to evaluate the bactericidal or bacteriostatic behavior of this compound. As shown in Figure 4, a time kill analysis was performed against the EA289 bacterial strain by using **5b** at a four times the MIC: 99.9% death (detection limit) occurred by 2 h.



**a** Outer membrane permeabilization

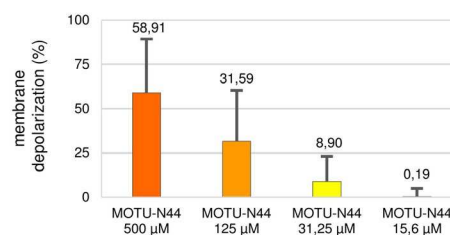
Aim : evaluation of nitrocefin hydrolysis



► MOTU-N44 permeabilizes the outer membrane of EA289 in a dose-dependent manner

**b** Inner membrane depolarization

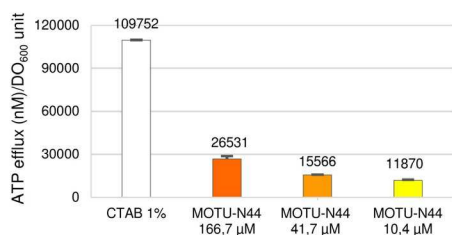
Aim : evaluation of diSC<sub>3</sub>(5) release



► MOTU-N44 disrupts the proton gradient of the EA289 membrane in a dose-dependent manner

**c** Membrane integrity

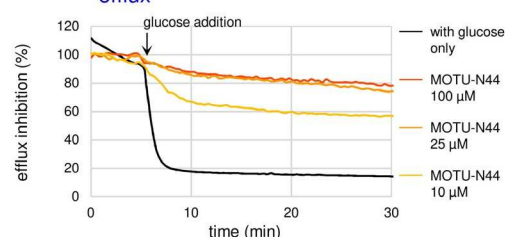
Aim : evaluation of ATP release



► MOTU-N44 affects the membrane integrity of EA289

**d** Efflux inhibition

Aim : evaluation of glucose-triggered 1,2'-diNA efflux

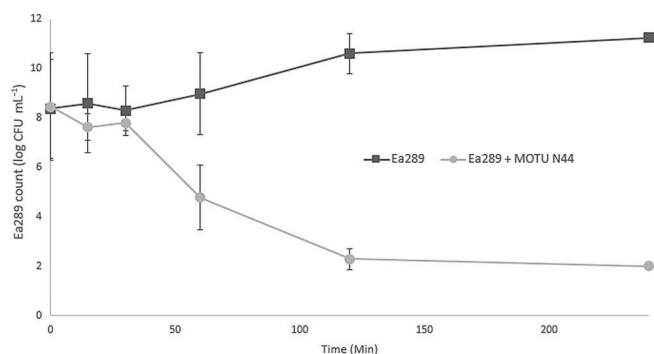


► MOTU-N44 inhibits the efflux pumps of EA289

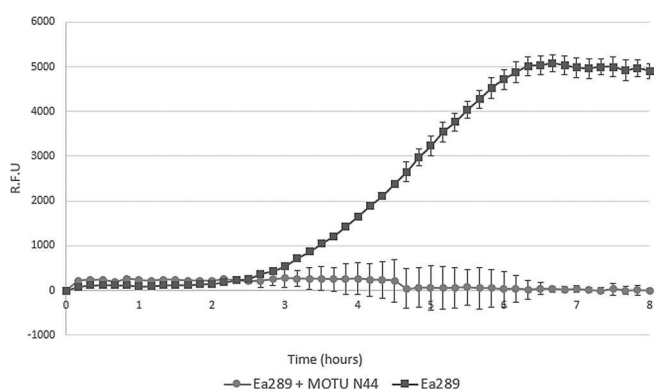
**Figure 3.** MOTU-N44 (**5b**) has multiple effects on the cell membrane of the Gram-negative bacterium *E. aerogenes* EA289. a) Outer-membrane permeabilization detected by nitrocefin hydrolysis, in a dose- and time-dependent manner. b) Dose-dependent inner-membrane depolarization quantified by the release of DiSC<sub>3</sub>(5). c) Membrane disruption revealed by ATP efflux. d) Inhibition of glucose-triggered 1,2'-diNA release via efflux pumps.

A cell viability assay (Figure 5) was performed by monitoring the irreversible reduction of blue resazurin to red resorufin by viable cells. This conversion is an oxidation–reduction indica-

tion in cell viability assays and can serve as an aerobic respiration measurement for bacteria.<sup>[34]</sup> When using **5b** at four times the MIC, there was clearly no cell viability.



**Figure 4.** Time-kill curves of **5b** (MOTU-N44, 4×MIC) over 4 h against EA289 bacteria.



**Figure 5.** Cell viability of EA289 in the presence of **5b** (MOTU-N44, 4×MIC).

Thus, the time-kill experiment shows that **5b** at four times MIC (200  $\mu\text{M}$ ) led to a decrease in live bacteria after 30 min. When the cells were incubated for 60 min at this concentration, the cell viability assay demonstrated total inhibition of respiratory metabolism allowing us to conclude that this decrease in bacterial count correlates highly with cell death.

The real-time assay demonstrated the ability of **5b** to inhibit efflux transport to around 60% by using a sub-inhibitory concentration (10  $\mu\text{M}$ , MIC/4). The results from the time-kill assay allow us to state that the cells remain viable in the efflux assay conditions ( $\leq 30$  min) and that the inhibition of the dye transport is a consequence of a specific action of the compound.

On the other hand, the nitrocefin hydrolysis and membrane depolarization assays suggest that efflux inhibition is probably due to disruption of membrane integrity thereby leading to proton-motive force dissipation. Indeed, the hydrolysis kinetics observed at a low concentration of **5b** demonstrated a slight effect on the membrane, thus correlating with the results obtained for the depolarization assay. We noted that outer-membrane permeation increased with increasing **5b** concentration, and this is likely responsible for cell death at high levels. We also note that the real-time assays required higher concentrations than those for fixed incubation times to generate a quantifiable signal.

Wang et al. recently described a similar action of the substituted diamine, 1,13-bis(((2,2-diphenyl)-1-ethyl)thioureido)-4,10-diazatridecane.<sup>[35]</sup> This diamine compound was also shown to

depolarize the cytoplasmic membrane and provide enhanced permeabilization of the outer bacterial membrane. Further structure–activity relationship studies revealed that the central diamine nitrogens were key to bioactivity. In contrast to the N-substituted systems, the unsubstituted diamines (putrescine and cadaverine) had no antibacterial activity, did not affect membrane permeability, and did not cause membrane rupture. Both of the higher polyamines (spermidine and spermine) were found to be inactive against *S. aureus* RN4220, *P. aeruginosa* PAO1 and *E. coli* ANS1. This, when coupled to our findings, suggests that either mono- or di-substituted polyamine systems can serve as antibacterial agents, whereas the unsubstituted native polyamine systems do not. Taken together, our studies also suggest that the presence of hydrophobic N-substituents is key to the ability of these compounds to target bacterial membranes and elicit a bacteriocidal response.

## Conclusion

Several polyamine derivatives were investigated for their intrinsic antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Derivatives **5a** and **5b** showed excellent activities (MIC 1.56–100  $\mu\text{M}$ ). In addition, **5b** dramatically affected the antibiotic susceptibility of *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* MDR strains. We conclude that changes in the transmembrane electrical potential in *E. aerogenes* EA289 correlate with permeabilization of the cell membrane by motuporamine derivatives, thereby leading to (or concomitantly facilitating) an altered proton homeostasis. Finally, motuporamine derivatives such as **5b**, that are able to disrupt the proton gradient, effectively de-energize the efflux pump and can be considered as efflux-pump inhibitors.

## Experimental Section

**Bacterial strains:** Eight bacterial strains (Institut Pasteur and personal collection) were used in this study. Gram-positive bacteria (*S. aureus* ATCC25923, *S. intermedius* 1051997, *Enterococcus faecalis* ATCC29212) and Gram-negative bacteria (*E. coli* ATCC28922, *P. aeruginosa* PAO1, *E. aerogenes* EA289, a Kan derivative of the MDR clinical isolate Ea27,<sup>[30]</sup> and *K. pneumoniae* KPC2 ST258) were stored at  $-80^\circ\text{C}$  in glycerol (15%, v/v). Bacteria were grown in Mueller-Hinton (MH) broth at  $37^\circ\text{C}$ .

**Antibiotics:** All the antibiotics were purchased from Sigma–Aldrich except fordoxycycline, which was purchased from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). All antibiotics were dissolved in water. The susceptibility of bacterial strains to antibiotics and compounds was determined in microplates by the standard broth dilution method, according to the recommendations of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).<sup>[36]</sup> Briefly, MICs were determined with an inoculum of  $10^5$  CFU in of MH broth (200  $\mu\text{L}$ ) containing twofold serial dilutions of each drug. MIC was defined as the lowest concentration to completely inhibit growth after incubation for 18 h at  $37^\circ\text{C}$ . Measurements were repeated in triplicate.

**Determination of antibiotic MIC in the presence of compounds:** Briefly, restoring enhancer concentrations were determined with an inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU in MH broth (200  $\mu\text{L}$ ) containing twofold



serial dilutions of each derivative and antibiotic (chloramphenicol, doxycycline, cefepime, or erythromycin;  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The lowest concentration of the polyamine adjuvant that completely inhibited growth after incubation for 18 h at  $37^\circ\text{C}$  was determined. Measurements were repeated in triplicate.

**Membrane depolarization assays:** Bacteria were grown in MH broth for 24 h at  $37^\circ\text{C}$  and centrifuged ( $3600g$ ,  $20^\circ\text{C}$ ). The pellet was washed twice with buffered HEPES (pH 7.2) sucrose (250 mM) and magnesium sulfate (5 mM). The fluorescent dye 3,3'-diethylthiocarbocyanine iodide was added ( $3 \mu\text{M}$ ) and allowed to penetrate into bacterial membranes by incubation for 1 h of at  $37^\circ\text{C}$ . Cells were then washed to remove the unbound dye before adding **5b** at different concentrations. Fluorescence measurements were performed on a FluoroMax 3 spectrofluorometer (Horiba; slit widths 5/5 nm). The relative corrected fluorescence (RFU) was recorded at 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, and 21 min. Maximum RFU was that recorded with a pure solution of the fluorescent dye in buffer ( $3 \mu\text{M}$ ).

**Nitrocefin hydrolysis assay:** Outer membrane permeabilization was measured by using nitrocefin, a chromogenic substrate of periplasmic  $\beta$ -lactamase. MH broth (10 mL) was inoculated with of an overnight culture (0.1 mL) of EA289 and grown at  $37^\circ\text{C}$  to  $\text{OD}_{600} = 0.5$ . The remaining steps were performed at room temperature. Cells were recovered by centrifugation ( $3600g$ , 20 min) and washed once with potassium phosphate buffer (PPB; 20 mM, pH 7.2) containing  $\text{MgCl}_2$  (1 mM). After another centrifugation, the pellet was resuspended in PPB (100  $\mu\text{L}$ ) and adjusted to  $\text{OD}_{600} = 0.5$ . Then, either Polymyxin B (positive control; Sigma-Aldrich) or **5b** (50  $\mu\text{L}$ ) was added to the cell suspension (100  $\mu\text{L}$ ) to final concentrations of 0.98–500  $\mu\text{M}$ . Nitrocefin (50  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; Oxoid) was added, and its hydrolysis was monitored spectrophotometrically by measuring the increase in absorbance at 490 nm. Assays were performed in 96-well plates with an M200 Pro spectrophotometer (Tecan).

**Glucose-triggered 1,2'-diNA efflux assays:** Bacteria were grown to stationary phase, collected by centrifugation, and resuspended to  $\text{OD}_{600} = 0.25$  in PPB (20 mM, pH 7.2) supplemented with carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 5  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich), and incubated overnight with 1,2'-dinaphthylamine (1,2'-diNA, 32  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich) at  $37^\circ\text{C}$ . Before addition of compound **5b** (100  $\mu\text{M}$ ), the cells were washed with phosphate buffer. Glucose (50 mM) was added after 300 s to initiate bacterial energization. Release of membrane-incorporated 1,2'-diNA was followed by monitoring the fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) every 30 s at  $37^\circ\text{C}$  in an Infinite M200 Pro plate reader (Tecan). Assays were performed in 96-well plates (half area, black with solid bottom, 100  $\mu\text{L}$  per well; Greiner Bio-One).

**Measurement of ATP efflux:** Squalamine were prepared in doubly distilled water at different concentrations. A suspension of growing *S. aureus* or *E. aerogenes* (EA289) in MH broth was incubated at  $37^\circ\text{C}$ . The suspension (90  $\mu\text{L}$ ) was added to squalamine solution synthesized in our laboratory according reported procedures (10  $\mu\text{L}$ ), and the mixture was vortexed for 1 s. Luciferin-luciferase reagent (Yelen, France; 50  $\mu\text{L}$ ) was immediately added, and luminescence was quantified with an Infinite M200 microplate reader (Tecan) for 5 s. ATP concentration was quantified by addition of a known amount of ATP (1  $\mu\text{M}$ ). A similar procedure was performed for spermine (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and for **5b** (200  $\mu\text{M}$ , i.e.,  $4\times\text{MIC}$ ).

**Time-killing assay:** Mid-log phase cultures of EA289 with an inoculum of  $10^7$  CFU/mL were incubated with **5b** ( $4\times\text{MIC}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  with 160 rpm shaking. Bacterial counts were performed after

0, 15, 30, 90, 120 and 240 min by spreading appropriate dilutions on MH agar plates (detection limit  $10^2$  CFU/mL $^{-1}$ ). The plates were incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$  before colonies were counted. The curves from two independent experiments were averaged and expressed as logarithms (mean  $\pm$  SE).

**Cell viability assay:** An overnight culture of EA289 was diluted 100-fold into MHII broth. An inoculum of  $10^7$  CFU/mL $^{-1}$  was incubated in the presence or absence of **5b** ( $4\times\text{MIC}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  with shaking at 160 rpm. The fluorescence of the cell suspension was monitored after addition of CellTiter-Blue reagent (10%, v/v; Promega). Measurements were performed by using a 96-well Greiner film-bottom black microplate (Greiner Bio-One) and an Infinite M200 microplate reader (Tecan;  $\lambda_{\text{ex}} = 568 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$ ). The curves from two independent experiments were combined (mean  $\pm$  SE).

**Synthesis of compounds 4–7:** The synthesis of **4–7** was previously reported.<sup>[15,37–41]</sup>

**Keywords:** antibiotics • antimicrobial agents • bacterial resistance • membranes • motuporamine • polyamine derivatives

- [1] *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance* WHO, 2014, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>.
- [2] P. Fernandes, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497–1503.
- [3] A. E. Pop-Vicas, E. M. C. D'Agata, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1792–1798.
- [4] J. M. Coelho, J. F. Turton, M. Kaufmann, J. Glover, N. Woodford, M. Warner, M.-F. Palepou, T. L. Pitt, B. C. Patel, D. M. Livermore, *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 3623–3627.
- [5] M. C. Jennings, K. P. C. Minbiole, W. M. Wuest, *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1*, 288–303.
- [6] C. Y. Wang, J. S. Jerng, K. Y. Chen, L. N. Lee, C. J. Yu, P. R. Hsueh, P. C. Yang, *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 63–68.
- [7] S. D. Mentzelopoulos, M. Pratikaki, E. Platsouka, H. Kraniotaki, D. Zervakis, A. Koutsoukou, S. Nanas, O. Paniara, C. Roussos, E. Giamarellos-Bourboulis, C. Routsis, S. G. Zakyntinos, *Intensive Care Med.* **2007**, *33*, 1524–1532.
- [8] A. Antoniadou, F. Kontopidou, G. Poulakou, E. Koratzanis, I. Galani, E. Papadomichelakis, P. Kopterides, M. Souli, A. Armaganidis, H. Giamarellou, *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 786–790.
- [9] M. E. Falagas, S. K. Kasiakou, *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *40*, 1333–1341.
- [10] S. Biswas, J.-M. Brunel, J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, J.-M. Rolain, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2012**, *10*, 917–934.
- [11] H. Labischinski, G. Barnickel, H. Bradaczek, D. Naumann, E. T. Rietschel, P. Giesbrecht, *J. Bacteriol.* **1985**, *162*, 9–20.
- [12] M. Vaara, *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 395–411.
- [13] H. Nikaido in *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Eds.: F. C. Neidhardt, R. Curtis III, J. L. Ingraham), 1st ed., ASM Press, Washington, **1996**, pp. 29–47.
- [14] R. E. W. Hancock, *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 37–42.
- [15] T. Murata, W. Tseng, T. Guina, S. I. Miller, H. Nikaido, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7213–7222.
- [16] M. Vaara, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 354–356.
- [17] H. Nikaido, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656.
- [18] M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389–395.
- [19] L. Djouhri-Bouktab, J. M. Rolain, J. M. Brunel, *Anti-Infect. Agents* **2014**, *12*, 95–103.
- [20] M. Blanchet, D. Borselli, J. M. Brunel, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 963–973.
- [21] C. Pieri, D. Borselli, C. Di Giorgio, M. De Méo, J.-M. Bolla, N. Vidal, S. Combes, J. M. Brunel, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4263–4272.
- [22] J. M. Brunel, A. Lieutaud, V. Lome, J.-M. Pagès, J.-M. Bolla, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1174–1179.
- [23] D. E. Williams, P. Lassota, R. J. Andersen, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4838–4841.

- [24] A. Muth, V. Pandey, N. Kaur, M. Wason, C. Baker, X. Han, T. R. Johnson, D. A. Altomare, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4023–4034.
- [25] A. Muth, M. Madan, J. J. Archer, N. Ocampo, L. Rodriguez, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 348–363.
- [26] K. Alhanout, S. Malesinki, N. Vidal, V. Peyrot, J. M. Rolain, J. M. Brunel, *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1688–1693.
- [27] T. Wieder, P. J. Sims, *J. Membr. Biol.* **1985**, *84*, 249–258.
- [28] O. Lomovskaya, M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, V. J. Lee, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 105–116.
- [29] Y. Matsumoto, K. Hayama, S. Sakakihara, K. Nishino, H. Noji, R. Iino, A. Yamaguchi, *PLoS One* **2011**, *6*, e18547.
- [30] M. Mallea, J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, J.-M. Pagès, *Microbiology* **1998**, *144*, 3003–3009.
- [31] M. Wu, R. E. W. Hancock, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29–35.
- [32] L. Amaral, A. Martins, G. Spengler, J. Molnar, *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 168.
- [33] J. A. Bohnert, S. Schuster, M. Szymaniak-Vits, W. V. Kern, *PLoS One* **2011**, *6*, e21196.
- [34] A. Mariscal, R. M. Lopez-Gigosos, M. Carnero-Varo, J. Fernandez-Crehuet, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *82*, 773–783.
- [35] B. Wang, B. Pachaiyappan, J. D. Gruber, M. G. Schmidt, Y.-M. Zhang, P. M. Woster, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3140–3151.
- [36] Members of the SFM Antibiogram Committee, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *21*, 364–391.
- [37] N. Kaur, J.-G. Delcros, B. Martin, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3832–3839.
- [38] C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2663–2671.
- [39] C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2672–2682.
- [40] C. Wang, J.-G. Delcros, L. Cannon, F. Konate, H. Carias, J. Biggerstaff, R. A. Gardner, O. Phanstiel IV, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5129–5138.
- [41] O. Phanstiel IV, N. Kaur, J.-G. Delcros, *Amino Acids* **2007**, *33*, 305–313.

---

Manuscript received: September 30, 2016

Final Article published: January 18, 2017

### DISCUSSION ARTICLE 3 :

Le développement de molécules adjuvantes permettant d'augmenter la concentration intracellulaire d'ATBs dans les souches résistantes constitue une solution alternative pour lutter contre l'antibiorésistance. Après avoir mesuré les CMI des dérivés sur différentes espèces bactériennes nous avons évalué leur activité adjuvante en les combinant avec des concentrations sous-inhibitrice d'ATB. L'association de la doxycycline à 2  $\mu\text{g/mL}$  avec différentes concentrations de dérivés a permis d'identifier deux groupes de molécules présentant des profils distincts, parmi lesquels les dérivés **MOTU-N33** et **MOTU-N44** présentent la meilleure activité adjuvante.

Pour la suite de l'étude nous avons choisi le composé **MOTU-N44** afin d'étudier son mode d'action et comprendre à l'échelle de la cellule comment s'opère la synergie. En effet, parmi les dérivés motuporamines, certains composés ont également montré une synergie avec d'autres ATBs tels que le chloramphénicol, l'érythromycine et le céfépime sur les BGN testées dans l'étude. Nous avons donc exploré le mécanisme d'action du dérivé selon deux hypothèses, (i) **MOTU-N44** provoque une action directe sur les composantes membranaires que sont la perméabilité et la FPM et, (ii) **MOTU-N44** inhibe les pompes d'efflux responsables du rejet des ATBs hors de la cellule bactérienne.

Les données expérimentales nous ont permis de conclure que les dérivés motuporamines provoquent des changements du potentiel de membrane qui sont la conséquence d'une perméabilisation de la cellule. En effet, l'ajout de **MOTU-N44** dans les cultures cellulaires de *S. aureus* conduisant à une diminution très importante de l'ATP intracellulaire traduisent une altération sévère de l'intégrité membranaire. Par ailleurs l'étude du mode d'action conduite sur la souche EA289 a permis d'observer un fort taux d'hydrolyse de la nitrocéfine en présence du composé **MOTU-N44** ce qui signifie que le composé est également capable d'altérer la perméabilité membranaire des BGN. En outre, la détection anormale d'ATP extracellulaire confirme ces résultats. De plus, l'utilisation de la sonde potentiométrique fluorescente, le  $\text{Disc}_3(5)$  nous a permis de mettre en évidence que l'ajout de **MOTU-N44** provoque une dépolarisation membranaire concentration-dépendante. Ces modifications de la FPM conduisent à une dé-énergisation des pompes d'efflux comme en témoignent les expériences d'efflux en temps réel qui ont montré une inhibition de l'efflux de 80% en présence de 25  $\mu\text{M}$  de

composé **MOTU-N44**. Ces résultats permettent de considérer les dérivés motuporamines comme des potentiels inhibiteurs d'efflux. Il faudrait maintenant évaluer l'effet de ces molécules dans une expérience d'efflux en temps réel afin de mesurer leur effet inhibiteur.



#### ARTICLE 4:

### **Polyamines derivatives as florfenicol's adjuvants and motility inhibitors to treat infections involving a porcine pulmonary pathogen:**

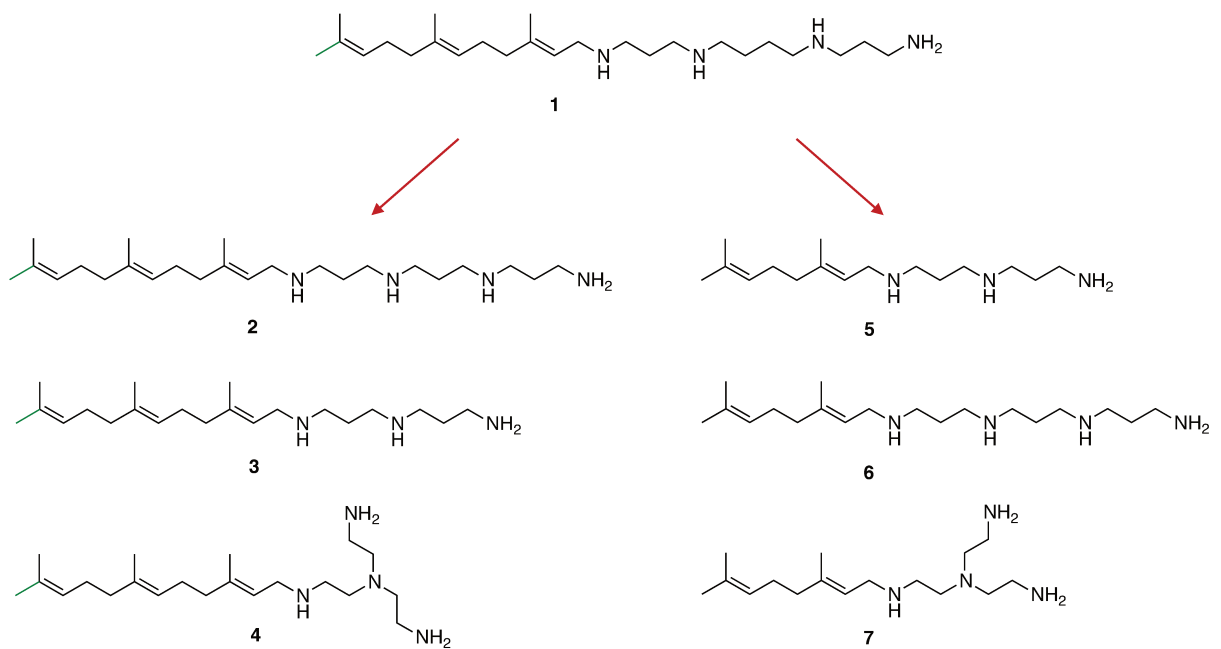
***Bordetella bronchiseptica*.** Diane Borselli, Jean Michel Brunel, Gérard-Marie Papierok, Jean-Marie Pagès, Jean-Michel Bolla

Le rejet de molécules ATBs dans l'environnement contribue largement à l'expansion du phénomène d'antibiorésistance. En effet, les déchets issus de l'industrie agroalimentaire et des élevages intensifs augmentent et sélectionnent les bactéries résistantes dans l'environnement (367). Cette pollution environnementale causée par les ATBs utilisés en médecine vétérinaire a des conséquences à la fois en santé animale mais également en santé humaine. Les bactéries sont capables d'échanger des gènes par transfert horizontal ce qui provoque la dissémination de gènes de résistance (368). Afin de limiter l'expansion de ce phénomène il est important d'agir sur les deux composantes, humaine et animale, pour cela il est crucial de diminuer la consommation d'ATBs en médecine vétérinaire et particulièrement dans les élevages tout en étant garant de la santé animale (369).

En Europe, les ventes d'ATBs pour les animaux producteurs de denrées représentaient 8122 tonnes en 2013 (370), et 60% de la consommation mondiale d'ATBs est destinée à l'industrie porcine (72). Les infections respiratoires sont la cause principale d'utilisation d'ATBs dans les élevages de porcs (371). Le coccobacille à Gram négatif *Bordetella bronchiseptica* provoque des pneumonies mais également des rhinites atrophiques responsables de la mort de nombreux animaux, surtout des jeunes porcelets (372). La présence d'un flagelle péritriche confère à la bactérie une virulence accrue car il lui permet de disséminer plus facilement dans le tractus respiratoire. Cependant son expression est régulée sous contrôle du système à deux composants, le système BvgAS qui régule par ailleurs l'expression d'autres facteurs de virulence (93).

Usuellement le traitement de ces infections se fait par les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides, le florfénicol ou par une combinaison entre le triméthoprime et les sulfamides (343), (240). En effet, il est recommandé de limiter le recours aux molécules de dernières générations comme les céphalosporines par exemple.

Dans le cadre de ma thèse, la société Virbac souhaitait que l'on s'intéresse particulièrement à diminuer les quantités de florfenicol utilisées dans les élevages de porcs. Afin de limiter son utilisation nous avons envisagé une approche combinatoire avec les dérivés polyamino-isopréniques décrit dans l'article 2. Nous avons utilisé la même approche de criblage sur des cellules entières afin de sélectionner un hit. Par la suite nous avons synthétisé de nouveaux dérivés dans une démarche de « hit to lead » afin d'augmenter l'activité du composé identifié lors du criblage. Afin d'établir des relations de structure-activité, nous avons également étudié le mode d'action de ces dérivés. Après avoir étudié l'activité du composé présentant le meilleur profil, nous avons déterminé ses paramètres de pharmacodynamique *in vitro*. Enfin, l'altération des différentes fonctions membranaires par le composé sélectionné nous a amené à évaluer ses effets sur la mobilité de la bactérie.



# **Polyamines derivatives as florfenicol's adjuvants and motility inhibitors to treat infections involving a porcine pulmonary pathogen: *Bordetella bronchiseptica***

Diane Borselli<sup>1</sup>, Jean Michel Brunel<sup>2</sup>, Gérard-Marie Papierok<sup>3</sup>, Jean-Marie Pagès<sup>1</sup>, Jean Michel Bolla<sup>1\*</sup>

**1** Aix-Marseille Université, IRBA, TMCD2 UMR-MD1, Faculté de Médecine, 13385 Marseille, France, **2** Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), CNRS, UMR7258, Institut Paoli Calmettes, Aix-Marseille Université, UM 105, Inserm, U1068, F-13009, Marseille, France, **3** Virbac, 1ère Avenue 8<sup>ème</sup> rue 06511 Carros

## Abstract

The constant increase of multidrug resistant bacteria and the lack of novel antibiotic molecules are leaving clinicians and veterinarians with very limited options to treat bacterial infections, especially those caused by Gram-negative pathogens. Veterinary pharmaceutical companies, including Virbac, must decrease the amount of antibiotics used to reduce chances of selection and transfer of antibiotic resistance to humans. Addition of chemosensitizers to decrease drug consumption in livestock, is one of the strategies currently considered. Florfenicol is a widely used drug to treat infections caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. Therefore, polyamino-isoprenic derivatives were assessed in combination with florfenicol, and an adjuvant was identified with potent activity on the sensitive reference strain as well as on swine isolates. Data showed that this molecule potentiated the antibiotic activity by increasing its intracellular concentration but also causes inner membrane depolarization that resulted in inhibition of efflux pumps, which are normally energized by the PMF. Because the rotor flagellum is dependent on the PMF, and considering that *B. bronchiseptica* flagellar motility represents an important virulence factor as it helps colonization, we tested the effect of the selected adjuvant on swimming and swarming motilities. The decrease of the motility observed, associated to resistance inhibition, suggests that this molecule could be used to decrease drug consumption and increase treatment efficacy.

## Introduction

In Europe, the overall sales of veterinary antimicrobials agents used in food producing animals represented 8,122 tones in 2013 (370), and the main use of antibiotics for animals concerns the pig industry (around 60%) (72). The release of antibiotics in the environment by livestock production is one of the major contributing factor for the emergence of bacterial resistance in both humans and animals (374), (375). The excreted waste material containing bioactive metabolites or the spreading of manure strongly contribute to the selection of resistant bacteria (367). This environmental pollution by veterinary antibiotics have implications in human health (368). Indeed, it is crucial to decrease the antibiotic consumption in veterinary field and particularly in livestock while preserving the animal health. Consequently, strategies have been proposed, and the most successful one consists of a dual drug approach that allows to enhance efficacy while minimizing the drug concentration (369). (280).

Respiratory diseases are a major cause of antibiotics usage in swine (371). The World Health Organization and the European Commission have published guidelines concerning the prudent use in food production animals, of cephalosporin of 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generation and fluoroquinolones which are considered as “critically important” antimicrobial agents in human medicine (370), (376). According to the international recommendations, the antimicrobials that could be used to treat porcine respiratory tract infections are tetracyclines, phenicols, macroclides, fluroroquinolones or with a combination of thrimetoprim and sulfonamides (373), (377). Most of the respiratory diseases in swine are treated with florfenicol, because it has a good distribution in the body and few side-effects. Although florfenicol is only used in veterinary medicine, a cross-resistance by efflux with its non-fluorinated analogue, chloramphenicol has been evidenced (240).

The Gram negative coccobacilli *Bordetella bronchiseptica* causing both pneumonia and atrophic rhinitis are one of the major respiratory pathogen in swine (372). In an ongoing project dedicated to reduce the florfenicol consumption in the livestock of swine during infection with *B. bronchiseptica*, we screened polyamino-isoprenic compounds as chemosensitizer of florfenicol on reference strain and animals isolates (378). After the selection of an efficient compound, we investigated its mode of action on the membrane functions and its consequence on the motility.

## Materials and methods

### **Bacterial strains and growth conditions**

The *B. bronchiseptica* strain used in this study comes from the Institut Pasteur collection, CIP 55.110. Ten isolates were obtained from the French laboratory Labofarm Loudéac (France). The bacterial identification was carried out by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry with comparison with the bacterial data base Brücker. All the strains were grown either on Columbia agar at 35°C for 24h to 48h or in Columbia broth at 35°C for 24h.

### **Antibiotics and Chemicals**

The antibiotic florfenicol was supplied by the pharmaceutical company Virbac (Carros, France). The antibiotic imipenem was purchased from Sequoia Research Products (Pangbourne, UK). All the chemicals polymyxin B, polymyxin B nonapeptide (PMBN), Phenylalanine-arginine beta-naphtylamide (PAβN), Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), di-methyl sulfoxide (DMSO), and benzalkonium chloride were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). The polyamino-isoprenic derivatives chemolibrary was described previously (379).

### **MIC determination**

Minimal Inhibitory Concentrations of antibiotic were measured by the microdilution broth method in 96-well microtiter plates using the two-fold dilution method and according to the NCCLS guidelines. The MIC was determined with an inoculum adjusted at  $5 \times 10^5$  CFU/mL in a final volume of 200  $\mu$ L.

### **High content screening**

The polyamino-isoprenic derivatives chemolibrary was screened at 10  $\mu$ M final concentration in the absence and in the presence of sub-inhibitory concentration of florfenicol (MIC/4) to identify only antibiotic adjuvants. We also added controls molecules as polymyxin B, PAβN, CCCP, CTAB and benzalkonium chloride at 10  $\mu$ M. The screening was performed in 96-well microtiter plates in Columbia broth with a final volume of 200  $\mu$ L and a DMSO final concentration of 2.5%. The bacterial inoculum was adjusted to  $5 \times 10^5$

CFU/mL. Microtiter plates were read at 600 nm on an Infinite M200 Pro plate reader (Tecan, Lyon, France) after 24h incubation at 35°C.

### **Checkerboard assay**

The combinations of derivative molecules with the florfenicol were tested using the microdilution checkerboard method, previously described (378). Briefly, an inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU/mL of *B. bronchiseptica* strain was added to 96-well microtiter plates containing a serial two-fold dilution of antimicrobial agents in Columbia broth. After incubation of plates during 24h at 35°C, we calculated the fractional inhibitory concentration indexes (FICIs) which allow to characterize the interaction of the combination between compounds and florfenicol.

$FICI = FIC A + FIC B$ , where  $FIC A = \frac{MIC_{\text{antibacterial A in combination}}}{MIC_{\text{antibacterial A alone}}}$  and  $FIC B = \frac{MIC_{\text{antibacterial B in combination}}}{MIC_{\text{antibacterial B alone}}}$ . The antibacterial combination was considered synergistic when the FICI was  $\leq 0.5$ , indifferent when  $0.5 < FICI \leq 4$  and antagonistic when  $FICI > 4$  (380).

### **Outer membrane permeabilisation assay**

Hundred milliliters of Columbia broth were inoculated with an overnight culture of a *B. bronchiseptica* isolate producing  $\beta$ -lactamases (isolate 77-A12). Once the cultures reached an the mid-logarithmic phase, cells were recovered by centrifugation (3,600 X g, 20min, 20°C) and washed twice in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) 1 mM  $MgCl_2$  (PPB) supplemented with 30  $\mu M$  of CCCP to block the efflux systems (378). After the second centrifugation, the cell suspension was adjusted to 0.5 OD 600 nm. One hundred microliters of the bacterial inoculum were mixed with 50  $\mu L$  of compound derivatives dilutions already set up in microplates, to give final concentrations ranging from 1.56 to 200  $\mu M$ . Then, 50  $\mu L$  of nitrocefin was added to obtain a final concentration of 50  $\mu g/mL$ . The absorbance at 490 nm was monitored to follow the nitrocefin hydrolysis using a Sunrise microplate reader (Tecan) over 2h30min. Experiments were performed in triplicate. For each compound, the efficacy of permeation was determined using the slope in the linear range, relatively to the slope obtained with 100  $\mu M$  polymyxin-B.

### **Real Time efflux assay**

The strain CIP55.110 was inoculated into 20 mL of Columbia broth and grown for 24h at 35°C to reach the stationary phase. Cells were recovered by centrifugation (3,600 X g 20 min, 20°C) and washed twice in PPB. The cell suspension was adjusted to 0.5 OD 600 nm and loaded with 1,2'-dinaphthylamine (TCI-Europe SA, Zwijnendrecht, Belgium) 32  $\mu$ M final concentration, in the presence of CCCP 30 $\mu$ M. After overnight incubation, cells were washed in PPB, the bacterial suspension was adjusted to 0.5 OD 600 nm. In a 96-well Greiner black microplate (Greiner, Courtabœuf, France) 50  $\mu$ L of the compounds were mixed with 100  $\mu$ L of the cell suspension yielding final concentration ranging from 12.5 to 200  $\mu$ M. The dye transport was triggered after addition of 5 $\mu$ L of Columbia broth addition and the fluorescence was monitored every 22 secs during 30 min on an Infinite M200 microplate reader (Tecan) (excitation wavelength 370 nm and emission 420 nm). Assays were performed in three independent experiments.

#### **Inner Membrane depolarization assay**

An overnight culture of CIP 55.110 was diluted 50-fold into 20 mL Columbia broth. After reaching an OD 600 nm of 0.5, cells were recovered by centrifugation (3,600 X g, 20 min, 20°C) and incubated 5 min at room temperature in 5 mM HEPES-10 mM EDTA (pH 7.0). They were then centrifuged (3,600 X g for 20 min at 20°C) and re-suspended in 5 mM HEPES (pH 7.0) supplemented with glucose 50 mM final concentration and adjusted to an OD 600 nm of 0.29. Fluorescence was monitored every 30 secs (excitation wavelength 622 nm, emission wavelength 690 nm) after addition of 5  $\mu$ L of a 160  $\mu$ M solution of [3,3'-dipropylthiadicarbocyanine iodide] (Disc3(5)) to 100  $\mu$ L of the cell suspension to reach a final concentration of 7.6  $\mu$ M. After a period of incubation (16.5 min) to allow the dye incorporation into the polarized membranes, 10  $\mu$ L of compound dilutions were added. The difference in the relative fluorescence values (RFU) from the control containing only buffer and the control containing untreated bacteria in buffer is taken as the maximum level of depolarization. Assays were performed in three independent experiments.

#### **Motility assay**

Swimming motility was evaluated on tryptone-agar plates (tryptone (1% w/v), 0.5 % NaCl (w/v), yeast extract 0.5 % (w/v)) supplemented with agar 0.3 % (w/v) (381). Swarming motility was evaluated on tryptone-agar plates supplemented with agar 0.5 % (w/v) (381). For both assays, sterilized tryptone-agar was dispensed to Petri dishes containing no

compound or Cp1 at 10  $\mu\text{M}$  and could dry at room temperature for 2h. An inoculum obtained after dilution of an overnight culture was adjusted to an OD 600 nm of 1.1. The plates were inoculated with a sterile toothpick and incubated in a non-reverse position at 35°C during the indicated times (24h, 48h or 72h) and halo diameters corresponding to bacterial growth were measured and reported. Assays were performed in three independent experiments.

### **Time kill study**

The effectiveness of the compound **1** (Cp1) and florfenicol combination against the reference strain CIP 55.110 was determined by the time-kill assay curves.

An overnight culture was diluted to 50-fold into 5 mL of Columbia agar and grown until the cell suspension reached the mid-logarithmic phase. The inoculum was then adjusted to  $10^7$  CFU/mL in Columbia broth supplemented with either, no addition, sub-inhibitory concentration of florfenicol that showed synergistic effect in combination with **1** (MIC/4), sub-inhibitory concentration of Cp1 (7.5 $\mu\text{M}$ ) that showed synergistic effect with florfenicol and sub-inhibitory concentration of both. Each tube containing 1 mL were incubated at 35°C and the bacterial count were determined after several times of incubation: 0, 1, 3, 6, 9, and 12h by spreading the appropriate dilutions on Columbia agar plates. The plates were incubated overnight at 35°C before colonies were counted. The curves result from two independent experiments and were averaged and expressed as logarithms with the standards errors (mean +/- SE).

## Results

### **High content screening: selection of a florfenicol's chemosensitizer**

A polyamino-isoprenic chemolibrary containing 60 molecules has been tested at 10  $\mu\text{M}$  concentration with addition of florfenicol at sub-inhibitory concentration (MIC/2 = 1 $\mu\text{g/mL}$ ) to identify compounds able to synergize the antibiotic. The screening has been performed on the reference strain of *B. bronchiseptica* CIP 55.110. To avoid compounds with intrinsic activity, the same experiment was performed in the absence of FFC. We then selected compounds that could kill bacteria in the presence of FFC and not alone. Amongst



the tested compounds, only the NV716 (Cp1) derivative showed 85% inhibition of bacterial growth in the presence of FFC at MIC/2.

### **Efficacy of compounds on animal isolates**

To extend our study, we evaluated the efficacy of the compound NV716 on 10 animal isolates. This compound could restore the susceptibility of 8/10 isolates to florfenicol. Two of them were still resistant both to florfenicol alone and to the combination (Figure 1). We note a difference in MIC depending on the method used, the MIC value is higher using the microdilution broth method than the value obtained in agar plate. Indeed this unconformity has been already reported (382).

### **Hit to lead procedure**

To improve the efficiency of the selected compounds, several derivatives were synthesized (compounds 2-7, Figure 2). In addition, to increase solubility and eliminate DMSO usage as a solvent to avoid artefactual activity, the tartrate salts were obtained for each compound. This allow to perform all experiments in water and increase the solubility of the compounds in bacteria growth media.

The compounds **2**, **3** and **4** share the farnesyl group with the compound **1** while the three others have a geranyl one. Moreover, each pair Cp2 / Cp6, Cp3 /Cp5 and Cp4 /Cp7 shares the same polyamine part (Figure 2). The molecule which shares its amine part with Cp1 and whose the isoprenic part is a geranyl has been already tested during the screening and did not show any activity.

### **Checkerboard assay and characterization of the interaction between derivatives and antibiotic**

To determine both the minimal efficient concentration of compounds and antibiotic, that are necessary to inhibit the bacterial growth, we performed a checkerboard assay on the reference strain CIP 55.110 and all animal isolates. Results are summarized in Table 2. The Cp1 exhibits a FIC index of about 0.5 that reflects the strong synergy between Cp1 and FFC used at MIC/2. We note that higher concentrations are needed to observe a synergy using FFC at MIC/4. We can also observe the same range of FIC index for the farnesyl compounds (Cp2-Cp4). Indeed, most of the FIC index could not be determined for

the geranyl ones (Cp5-Cp7) due to the high concentrations needed to observe the bacterial growth inhibition.

### **Presence of an active efflux in *B. bronchiseptica***

For all the strains tested, we observed a MIC for FFC of about 2 to 4mg/L except for two strains 42-F10 and SR11-14 that exhibit a MIC over the resistance breakpoint of  $\geq$  8mg/L (242). We have previously shown that efflux mechanisms are produced at a basal level in Gram negatives (378), (383), and can account for low-level resistance (as it is the case here for most strains studied) that can be strongly induced when exposed to toxic compounds (384), (385). Thus, we were wondering if *B. bronchiseptica* could efflux the dye and other substrates. For this purpose, we primary evaluated the ability of the strain CIP55.110 to expel a fluorescent dye the 1,2'dNA that is a substrate of efflux pumps (386) The same experiment as previously published was performed (378). We first observed an accumulation of the dye after addition of CCCP 30mM final concentration while no accumulation was observed without its addition. This suggested that the uncoupler CCCP was necessary to block active expulsion of the dye by the bacteria. In addition, when loaded bacteria were incubated with culture media, we observed a decrease of fluorescence demonstrating an active efflux. As shown in figure 3 the strain CIP55.110 could expel 60% of the pre-loaded dye that allow us to compare the ability of the compounds to inhibit the efflux system.

### **Mode of action of the derivatives**

Considering the previous results obtained from the checkerboard assay, we get interested in structure-activity relationship studies.

To understand how the derivatives potentiate the antibiotic activity, and especially the farnesyl ones we evaluate first, if they can increase the intracellular concentration of the antibiotic by blocking the efflux system. We adapted the protocol we developed for *P. aeruginosa* in a previous study (378). We evaluated the ability of the compounds to block the efflux system in *B. bronchiseptica*. We tested all compounds at 100  $\mu$ M concentration (Fig3a). The Cp1 and the Cp2 inhibit the dye efflux around 50%, the Cp3 and the Cp4 shows respectively only 30% and 17% efflux inhibition while the geranyl derivatives (Cp5-Cp7) did not show even a slight effect. These data show that the synergy observed results at least in part, from the inhibition of efflux transport of FFC.

The other parameter that could influence the intracellular concentration is the outer-membrane permeability. We evaluated the permeabilisation activity of the polyamino-isoprenic derivatives using nitrocefin hydrolysis method that have been previously described (378). We used the isolate 77-A12 that produces  $\beta$ -lactamase (see amoxicillin MIC in Table S1). The results are presented in the figure 4a. Interestingly, the geranyl compound (Cp5-Cp7) do not exhibit any permeabilization activity while, farnesyl compounds (Cp1-Cp4) permeabilize the outer membrane from 30 to 50% considering 100  $\mu$ M of polymyxine-B lead to the maximum rate of permeation. However, no influence of the amine structure was detected, Cp4 (branched amine) shows similar activity with the three other farnesyl compounds with linear amine. Considering that compounds inhibit efflux of the fluorescent dye and, that *B. bronchiseptica* efflux transport is inhibited by CCCP (Fig. 3a), we were wondering if the derivatives could also influence the cell energy like proton motive force across the inner membrane of *B. bronchiseptica*. As we can observe on the graph presented in figure 4b the addition the derivatives cause the increase of the level of fluorescence that reflects the destabilization of the proton-motive force. Indeed, the Cp1 and the Cp2 cause the most important depolarization at about 60% of the inner membrane at 100 $\mu$ M concentration. Surprisingly, the derivative Cp6 is also able to depolarize the inner membrane at 40% as the Cp4. Nevertheless, we observe a slight effect for the molecules Cp5 and Cp7 which depolarize the inner membrane respectively at 20% and 10%. Molecules that cause the most important depolarization remain the farnesyl ones while the geranyl compounds show the lower rate of depolarization. In addition, the presence of branched amine on the farnesyl moiety strongly influence the activity (compare Cp1/Cp4, Cp2/Cp4) with the exception of Cp3, but one must considered that its polyamine part is composed of only 3 amines whereas the other ones harbor 4 amines. Thus, conversely to the results obtained from the outer membrane permeation assays, herein the activity not only depends on the isoprenic moiety of the compound but also of the polyamine structure.

### **CEP290 and motility inhibition**

As the derivatives can largely impair the proton-motive force and, particularly the Cp1, we were wondering if this compound could influence motility flagella dependent whose energy is triggered by the PMF. We tested here, the ability to the Cp1 to inhibit the motility swimming and swarming on two strain of *B. bronchiseptica*, the CIP 55.110 which

is susceptible to FFC and the SR11-14 which is resistant both to FFC and to the combination FFC/1. We measured the diameter of the motility halo after 24 hours of incubation at 25°C to allow the expression of flagella genes.

We compared the motility of each strain in presence and absence of Cp1 and considering the flagella could use both the protons and sodium gradient, we tested two conditions, +/- NaCl.

In the graph shown in graph 5a we observed that 10  $\mu$ M of the Cp1 inhibit the swimming motility at about 40% for both strains. In the graph 5b, we observe a slight effect of the Cp1 which inhibits the swarming motility between 20% and 30% depending on the strain considered. However, the motility inhibition by Cp1 is more important without NaCl, especially for the swarming motility (graph 5b), indeed, we observe more than 40% inhibition. These results strongly suggest that Cp1 inhibits flagella motilities by disrupting the PMF.

### **Time effect on growth**

To further characterize this combination, the *in vitro* pharmacodynamic (PD) parameters of the combination was evaluated using time-kill kinetics assays (Fig 6). Curves were obtained by plotting the number of CFU at every time point for the synergistic concentrations of the drugs.

As expected, the florfenicol at sub-inhibitory concentration (MIC/4) has no effect on the cell growth such as the Cp1 used at a concentration which corresponds to its MIC/32; while the combination of both inhibits totally the cell growth. After 9 hours of incubation, the reduction of bacterial cell count was around 2 Log for the combination compared to the three other conditions. After 12 hours of incubation the cell count was still reduced of 4 Log which shows a significant effect of the combination compared to the same antimicrobials administered alone (Fig 6). The combination FFC / Cp1 appears to be bacteriostatic as FFC is alone which support that Cp1 restores the FFC activity according to the MIC results.

## Discussion

For the first time, we address the problematic of the antibiotic consumption in the livestock. Here we described the use of adjuvant molecule to enhance the antibiotic activity, in our case florfenicol, that allow us to decrease by four the MIC of the main strains tested here with small quantities of polyamino-isoprenic derivative. These molecules are known to potentiate antibiotics by acting on membrane functions (338). In this study, we choose to address only the susceptibility of florfenicol because the international and European authorities requested to use with parsimony antibiotics which are used both in human and veterinary medicine. But even if florfenicol is only use to treat animal infections it presents a cross resistance with chloramphenicol, so this is still important to reduce its use and so prevent the spread of gene transfer to the human

As our previous study (378), showed interesting results on the antibiotic potentialisation on bacteria responsible of respiratory infections we screened our polyamino-isoprenic chemolibrary as 10  $\mu$ M on the reference strain of *B. bronchiseptica*, CIP 55.110 with sub-inhibitory concentration of florfenicol. We so identified one compound, the NV716 (Cp1) as potential florfenicol's adjuvant. To valid the efficacy of this compound we evaluated its activity on 10 animal isolates and the derivative could restore the susceptibility of 8/10 isolates. Two isolates resistant to florfenicol remain resistant to the combination, but we think this resistance involves an unknown mechanism, such as an enzymatic one that we are investigating in another study.

From this hit compound, we assay to develop other derivatives in a hit to lead procedure to improve its activity. We so synthesized six other derivatives, three geranyl ones and their corresponding farnesyl homologues. To check their efficacy, we tested them with a checkerboard assay. First, we note that the Cp1 remains the compound which exhibits the lowest efficiency concentration to potentiate the antibiotic. Then, the farnesyl compounds sowed a best efficiency as the Cp1, instead of the geranyl ones which are less effective. As polyamines agents are known to disrupt membranes we investigate the effect of the compound on membrane function. The first parameter we studied was the permeability of the outer membrane which is well known for opposing the antibiotic accumulation into the cell in gram negative bacteria. As expected, compounds possess the ability to increase the cell permeability. The farnesyl compounds are the best permeabilizers compared to the geranyl compounds. As we showed in our previous study,

the derivatives could also increase the intracellular antibiotic concentration by blocking the efflux system present in the cell. However, the presence of efflux pump in *B. bronchiseptica* has never been demonstrated clearly before. We first, investigate the putative presence of an active efflux in *B. bronchiseptica* and we demonstrated it by using CCCP that allow the dye loading into the membranes. These results corroborate the genome sequence data from *B. pertussis* suggesting the presence putative RND efflux pumps coding sequences (387) and this is the first time we measured the efflux in *B. bronchiseptica*. Thereby, we evaluated the effect of the Cp1 and its derivatives on the efflux system of *B. bronchiseptica*. The molecules able to inhibit the dye efflux are the farnesyl ones while the geranyl derivatives show no ability to block the efflux system. The Cp1 and the Cp4 show 50 % inhibition at 100  $\mu$ M, they thus exhibit the best efficiency to inhibit the dye efflux. Moreover, we observed a dose response effect for each farnesyl compounds. These results agree the previous ones and let think there is a link between the two measured parameters and they show the farnesyl part of our molecules seems to be essential for their activity.

From these results, we were wondering if the compounds could influence another membrane function, the proton motive force across the inner membrane, which is required for many cell process, as energy of the efflux system. The Cp1 and its derivatives could depolarize the inner membrane expected the compounds Cp5 and Cp7 which show an inhibition of the proton motive force less than 20%.

As the flagella is depending on the proton motive force to spin and it allows the host colonization, it constitutes a virulence factor. Thereby, the flagella could be considered a new target, and the development of motility inhibitors is considered as a new strategy to fight against the spread of bacterial infection (297). We tested the effect of the best compound, the Cp1, and we observed a significant inhibition on the flagella-dependents motilities by the Cp1. However, we show that *B. bronchiseptica* is also able to use the sodium gradient, but we were not able to discriminate if the Cp1 targets preferentially the proton or sodium gradient. On the other hand, we underline that the inhibition of motility occurs in an independent way of the resistance's level of the strain so it could even be used only for this property.

Finally, to better characterize the combination antibiotic with derivative we did time kill assay at the concentrations which have shown synergistic effect. These FFC / Cp1

combination reduces the antibiotic efficient concentration by 4 and so could reduce drastically the amount of administered antibiotic level.

## References

1. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*. 18 févr 2005;365(9459):579-87.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge: time to react [Internet]. Stockholm; 2009. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2009/11/WC500008887.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500008887.pdf)
3. ANSES A, Sécurité publique France. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable [Internet]. 2016 nov. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Bien-utiliser-les-antibiotiques/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Bien-utiliser-les-antibiotiques/(offset)/0)
4. ANSES. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015 [Internet]. 2016 oct. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2015.pdf>
5. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 1 févr 2004;23(2):113-9.
6. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. janv 2011;24(1):71-109.
7. Toutain P. Le médicament vétérinaire et le médicament humain : similitudes, différences et enjeux de santé publique. In Toulouse; 2007. Disponible sur: [http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/ppt/final\\_med\\_veto\\_site\\_2007-2.ppt](http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/ppt/final_med_veto_site_2007-2.ppt).
8. ANSES. Index des Médicaments Vétérinaires autorisés en France - Doxycycline [Internet]. Disponible sur: <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=PULMODOX+500+MG%2FG+GRANULES+POUR+SOLUTION+BUVABLE+POUR+PORCS%2C+POULETS+ET+DINDES>
9. ANSES. Index des Médicaments Vétérinaires autorisés en France - Florfénicol [Internet]. Disponible sur: <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=FLORGANE+300+MG%2FML+SUSPENSION+INJECTABLE+POUR+BOVINS+ET+PORCINS>
10. Madec J-Y, Gay E. Antibiorésistance : le passage animal - Homme, mythe ou réalité ? 2012;50\_52.
11. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*. août 2001;32(3-4):201-25.
12. Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Plan EcoAntibio 2012-2017. 2012.
13. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol*. août 2013;303(6-7):293-7.
14. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. août 2013;303(6-7):287-92.
15. Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp*. 1997;207:15-27-35.

16. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2000;44(7):1771-7.
17. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* janv 2015;13(1):42-51.
18. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* déc 2003;67(4):593-656.
19. Obst S, Kastowsky M, Bradaczek H. Molecular dynamics simulations of six different fully hydrated monomeric conformers of Escherichia coli re-lipopolysaccharide in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup>. *Biophys J.* mars 1997;72(3):1031-46.
20. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* sept 1992;56(3):395-411.
21. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1 avr 2006;19(2):382-402.
22. Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resist Updat.* sept 2016;28:13-27.
23. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* avr 2010;8(4):251-9.
24. Bolla J-M, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, et al. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 6 juin 2011;585(11):1682-90.
25. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol.* oct 2015;13(10):605-19.
26. Zgurskaya HI, López CA, Gnanakaran S. Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis.* 13 nov 2015;1(11):512-22.
27. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol.* 2014;4:422.
28. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:17-38.
29. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* déc 2008;6(12):893-903.
30. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 29 juill 2005;57(10):1486-513.
31. Walsh F, Amyes SGB. Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother.* 1 août 2007;19(4):376-81.
32. Masi M, Pagès J-M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the OmpF/C - TolC Case. *Open Microbiol J.* 2013;7:22-33.
33. Dé E, Baslé A, Jaquinod M, Saint N, Malléa M, Molle G, et al. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Mol Microbiol.* 1 juill 2001;41(1):189-98.
34. Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* juin 1996;20(5):911-7.
35. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-



Rico M, et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*. 2016;4(1).

36. Bambeke FV, Michot J-M, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *J Antimicrob Chemother*. 1 mai 2003;51(5):1067-77.
37. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1980;77(7):3974-7.
38. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 sept 2000;44(9):2242-6.
39. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 10 oct 2002;419(6907):587-93.
40. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*. 22 juin 2000;405(6789):914-9.
41. Kim J-S, Jeong H, Song S, Kim H-Y, Lee K, Hyun J, et al. Structure of the tripartite multidrug efflux pump AcrAB-TolC suggests an alternative assembly mode. *Mol Cells*. 2015;38(2):180-6.
42. Nikaido H, Pagès J-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1 mars 2012;36(2):340-63.
43. Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol*. déc 2004;14(6):741-7.
44. Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Turner RJ, Weiner JH, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol*. 1 mars 1996;19(6):1167-75.
45. Ma C, Chang G. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 mars 2004;101(9):2852-7.
46. Nasie I, Steiner-Mordoch S, Schuldiner S. New substrates on the block: clinically relevant resistances for EmrE and homologues. *J Bacteriol*. déc 2012;194(24):6766-70.
47. Kikukawa T, Nara T, Arais T, Miyauchi S, Kamo N. Two-component bacterial multidrug transporter, EbrAB: Mutations making each component solely functional. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. mai 2006;1758(5):673-9.
48. Nasie I, Steiner-Mordoch S, Gold A, Schuldiner S. Topologically random insertion of EmrE supports a pathway for evolution of inverted repeats in ion-coupled transporters. *J Biol Chem*. 14 mai 2010;285(20):15234-44.
49. Li X-Z, Poole K, Nikaido H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2003;47(1):27-33.
50. Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, et al. NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 1998;42(7):1778-82.
51. Long F, Rouquette-Loughlin C, Shafer WM, Yu EW. Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 sept 2008;52(9):3052-60.
52. Saier MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, et al. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. nov 1999;1(2):257-79.

53. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* oct 1996;178(20):5853-9.
54. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2009;10(3):218-27.
55. Fath MJ, Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev.* déc 1993;57(4):995-1017.
56. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* mai 2001;152(3-4):205-10.
57. Bolhuis H, Veen HW van, Brands JR, Putman M, Poolman B, Driessen AJM, et al. Energetics and Mechanism of Drug Transport Mediated by the Lactococcal Multidrug Transporter LmrP. *J Biol Chem.* 27 sept 1996;271(39):24123-8.
58. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* août 2000;2(10):1225-35.
59. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 16 mai 1980;289(1036):321-31.
60. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 1989;33(3):259-63.
61. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juin 1995;39(6):1211-33.
62. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.* août 1987;6(4):439-45.
63. Lavigne J-P, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in a French Hospital. *J Clin Microbiol.* 1 août 2004;42(8):3805-8.
64. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a Novel Complex Mutant of TEM-Type  $\beta$ -Lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 déc 2004;48(12):4528-31.
65. Barthélémy P, Autissier D, Gerbaud G, Courvalin P. Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. A new mechanism of resistance. *J Antibiot (Tokyo).* déc 1984;37(12):1692-6.
66. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 1 oct 1999;2(5):499-503.
67. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* nov 2004;28(5):519-42.
68. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* avr 2001;7(2):337.
69. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2000;44(6):1549.
70. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 juin 2001;65(2):232-60.
71. Lesage M. Les antibiotiques en élevage: vers des solutions intégrées. Centre d'étude et de prospective: Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt; Report No.: n°82, septembre 2015.

72. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents*. juin 2001;17(6):431-7.
73. Afssa. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine [Internet]. 2006 janv. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-ABR.pdf>
74. Vandaële E. Le lien entre l'usage d'antibiotiques et l'antibiorésistance est-il établi ? *Le point vétérinaire*, n°331 [Internet]. 12 janv 2012; Disponible sur: <http://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article-rural/n-331/le-lien-entre-l-usage-d-antibiotiques-et-l-antibioresistance-est-il-etabli.html>
75. Dupraz P. Interdiction des promoteurs de croissance antibiotiques et commerce international. In 2004. p. 151-8.
76. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet*. sept 2003;35(1):32-40.
77. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev*. 1 déc 1980;44(4):722-38.
78. Richter GW, Kress Y. Electron Microscopy of a Strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 1 oct 1967;94(4):1216-24.
79. Plotkin BJ, Bemis DA. Carbon source utilisation by *Bordetella bronchiseptica*. *J Med Microbiol*. 1998;47(9):761-5.
80. Bemis DA, Carmichael LE, Appel MJ. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet*. avr 1977;67(2):282-93.
81. Cross RF. *Bordetella bronchiseptica*-induced porcine atrophic rhinitis. *J Am Vet Med Assoc*. 15 déc 1962;141:1467-8.
82. Tornøe N, Nielsen NC, Svendsen J. *Bordetella bronchiseptica* isolations from the nasal cavity of pigs in relation to atrophic rhinitis. *Nord Vet Med*. janv 1976;28(1):1-18.
83. Woolfrey BF, Moody JA. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev*. 1 juill 1991;4(3):243-55.
84. Gueirard P, Weber C, Coustumier AL, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol*. 1 août 1995;33(8):2002-6.
85. Ner Z, A. Ross L, Horn MV, Keens TG, MacLaughlin EF, Starnes VA, et al. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 1 oct 2003;7(5):413-7.
86. Uhl MA, Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 févr 1994;91(3):1163.
87. Uhl MA, Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J*. 1 mars 1996;15(5):1028.
88. Stibitz S, Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 1 juill 1991;173(14):4288-96.
89. Aricó B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, et al. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1989;86(17):6671.
90. Dupré E. La régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis* : BvgS, modèle original de capteur de système à deux composants [Internet] [phdthesis]. Université du

Droit et de la Santé - Lille II; 2013 [cité 18 oct 2016]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01138645/document>

91. Coote JG. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol*. nov 1991;137(11):2493-503.
92. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzmán CA. A Second Two-Component Regulatory System of *Bordetella bronchiseptica* Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence. *Infect Immun*. oct 1998;66(10):4640.
93. Mattoo S, Cherry JD. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 1 avr 2005;18(2):326-82.
94. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, et al. Pertactin Is Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect Immun*. 1 juill 2010;78(7):2901-9.
95. Guo Q, Shen Y, Lee Y-S, Gibbs CS, Mrksich M, Tang W-J. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J*. 21 sept 2005;24(18):3190-201.
96. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol*. 1 févr 2001;4(1):82-9.
97. Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, et al. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect Immun*. 1 janv 1991;59(1):337-45.
98. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and Strain-Specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol*. 1 mars 2006;188(5):1775-85.
99. Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF. The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol*. 1 févr 1992;174(3):980-90.
100. Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *bordetella*-host interaction. *Cell*. 24 févr 1995;80(4):611-20.
101. Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*. 1 janv 2002;291(8):605-14.
102. Giardina PC, Foster LA, Musser JM, Akerley BJ, Miller JF, Dyer DW. *bvg* Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. *J Bacteriol*. nov 1995;177(21):6058-63.
103. Brickman TJ, Armstrong SK. Alcaligin Siderophore Production by *Bordetella bronchiseptica* Strain RB50 Is Not Repressed by the *BvgAS* Virulence Control System. *J Bacteriol*. 15 déc 2002;184(24):7055-7.
104. Pasteur L. De l'atténuation du virus du choléra des poules [Internet]. 1880 oct. Disponible sur: [http://www.academie-sciences.fr/archivage\\_site/fondations/lp\\_pdf/CR1880\\_p673.pdf](http://www.academie-sciences.fr/archivage_site/fondations/lp_pdf/CR1880_p673.pdf)
105. Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (1---4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carbohydr Res*. janv 1992;223:329-33.
106. Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol*. 29 sept 2000;83(1-2):153-60.
107. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular

- Microbiology. Clin Microbiol Rev. 1 juill 2013;26(3):631-55.
108. DeAngelis PL, White CL. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. J Biol Chem. 1 mars 2002;277(9):7209-13.
  109. Rimler RB, Rhoades KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol. avr 1987;25(4):615.
  110. DeAngelis PL, Gunay NS, Toida T, Mao W, Linhardt RJ. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. Carbohydr Res. 27 sept 2002;337(17):1547-52.
  111. Harper M, Boyce JD, Adler B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. Curr Top Microbiol Immunol. 2012;361:39-51.
  112. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett. déc 2006;265(1):1-10.
  113. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. sept 1972;16(4):925-36.
  114. Muhairwa AP, Christensen JP, Bisgaard M. Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. Avian Pathol J WVPA. avr 2000;29(2):133-42.
  115. Blackall P, Pahoff J, Marks D, Fegan N, Morrow C. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. Aust Vet J. 1 avr 1995;72(4):135-8.
  116. Descamps S, Jenouvrier S, Gilchrist HG, Forbes MR. Avian Cholera, a Threat to the Viability of an Arctic Seabird Colony? Ropert-Coudert Y, éditeur. PLoS ONE. 15 févr 2012;7(2):e29659.
  117. Strugnell BW, Dagleish MP, Bayne CW, Brown M, Ainsworth HL, Nicholas RAJ, et al. Investigations into an outbreak of corvid respiratory disease associated with *Pasteurella multocida*. Avian Pathol. 1 juin 2011;40(3):329-36.
  118. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev. déc 2007;8(2):129-50.
  119. Dyer NW, Ward AC, Weiser GC, White DG. Seasonal incidence and antibiotic susceptibility patterns of Pasteurellaceae isolated from American bison (*Bison bison*). Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire. janv 2001;65(1):7-14.
  120. Rhodes MB, New CW, Baker PK, Hogg A, Underdahl NR. *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida* as agents of severe atrophic rhinitis of swine. Vet Microbiol. févr 1987;13(2):179-87.
  121. Lewis KT, Stiles M. Management of cat and dog bites. Am Fam Physician. août 1995;52(2):479-85, 489-90.
  122. Oehler RL, Velez AP, Mizrachi M, Lamarche J, Gompf S. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. Lancet Infect Dis. juill 2009;9(7):439-47.
  123. Pedersen KB, Barfod K. The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord Vet Med. déc 1981;33(12):513-22.
  124. Chanter N, Magyar T, Rutter JM. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. Res Vet Sci. juill 1989;47(1):48-53.
  125. Cowart RP, Bäckström L, Brim TA. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. Can J Vet Res Rev Can Rech

Veterinaire. juill 1989;53(3):295-300.

126. Horiguchi Y. Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotica* toxin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;361:113-29.
127. Kureljušić B, Weissenbacher-Lang C, Nedorost N, Stixenberger D, Weissenböck H. Association between *Pneumocystis* spp. and co-infections with *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* in Austrian pigs with pneumonia. *Vet J Lond Engl* 1997. janv 2016;207:177-9.
128. Kielstein P. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella multocida*-strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B.* août 1986;33(6):418-24.
129. Davies RL, MacCorquodale R, Baillie S, Caffrey B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J Med Microbiol.* janv 2003;52(Pt 1):59-67.
130. Deeb BJ, DiGiacomo RF, Bernard BL, Silbernagel SM. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J Clin Microbiol.* janv 1990;28(1):70-5.
131. Rf D, Bj D, Jr GW, Bl B, Mm C. Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res.* 1989 1989;50(9):1460-5.
132. DiGiacomo RF, Deeb BJ, Brodie SJ, Zimmerman TE, Veltkamp ER, Chrisp CE. Toxin production by *Pasteurella multocida* isolated from rabbits with atrophic rhinitis. *Am J Vet Res.* août 1993;54(8):1280-6.
133. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida* toxin. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 430-47. Disponible sur:  
[https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=gFol3jKI03EC&oi=fnd&pg=PA430&dq=Wilson+BA+2006+multocida&ots=uChYta0BOh&sig=OdHGFA0\\_uYyQ4YuV\\_7U62NxMZKk#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=gFol3jKI03EC&oi=fnd&pg=PA430&dq=Wilson+BA+2006+multocida&ots=uChYta0BOh&sig=OdHGFA0_uYyQ4YuV_7U62NxMZKk#v=onepage&q&f=false)
134. Chanter N, Rutter JM. Colonisation by *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs and immunity to the osteolytic toxin. *Vet Microbiol.* nov 1990;25(2-3):253-65.
135. Felix R, Fleisch H, Frandsen PL. Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption in vitro. *Infect Immun.* déc 1992;60(12):4984-8.
136. Mullan PB, Lax AJ. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* oct 1998;63(4):340-5.
137. Ramdani null, Dawkins HJ, Johnson RB, Spencer TL, Adler B. *Pasteurella multocida* infections in mice with reference to haemorrhagic septicaemia in cattle and buffalo. *Immunol Cell Biol.* févr 1990;68 ( Pt 1):57-61.
138. Dendle C, Looke D. Review article: Animal bites: an update for management with a focus on infections. *Emerg Med Australas EMA.* déc 2008;20(6):458-67.
139. Garcia VF. Animal bites and *Pasteurella* infections. *Pediatr Rev.* avr 1997;18(4):127-30.
140. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* mai 1984;63(3):133-54.
141. Jones AG, Lockton JA. Fatal *Pasteurella multocida* septicaemia following a cat bite in a man without liver disease. *J Infect.* nov 1987;15(3):229-35.
142. Desai SS, Groves RJ, Glew R. Subacute *Pasteurella* osteomyelitis of the hand following dog bite. *Orthopedics.* juin 1990;13(6):653-6.
143. Guion TL, Sculco TP. *Pasteurella multocida* infection in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1 juin 1992;7(2):157-60.

144. Khan MF, Movahed MR, Jung J. *Pasteurella multocida* endocarditis. *J Heart Valve Dis.* mars 2012;21(2):260-2.
145. Hombal SM, Dincsoy HP. *Pasteurella multocida* endocarditis. *Am J Clin Pathol.* déc 1992;98(6):565-8.
146. Levin JM, Talan DA. Erythromycin failure with subsequent *Pasteurella Multocida* meningitis and septic arthritis in a cat-bite victim. *Ann Emerg Med.* 1 déc 1990;19(12):1458-61.
147. Klein NC, Cunha BA. *Pasteurella multocida* pneumonia. *Semin Respir Infect.* mars 1997;12(1):54-6.
148. Drabick MJJ, Gasser Jr. LCRA, Saunders NB, Hadfield MTL, Rogers CLC, Berg MBW, et al. *Pasteurella multocida* Pneumonia in a Man With AIDS and Nontraumatic Feline Exposure. *Chest.* janv 1993;103(1):7-11.
149. Sugino Y, Kato M, Yagi A, Kawabata A. [*Pasteurella multocida* pneumonia with molecular evidence of zoonotic transmission]. *Kansenshogaku Zasshi.* nov 2007;81(6):726-30.
150. Boyce JD, Adler B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Curr Opin Microbiol.* févr 2006;9(1):117-22.
151. Carter GR, Chengappa MM. Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *J Clin Microbiol.* 1 janv 1980;11(1):94-6.
152. Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb Pathog.* 1 juill 2000;29(1):25-38.
153. Paustian ML, May BJ, Kapur V. *Pasteurella multocida* Gene Expression in Response to Iron Limitation. *Infect Immun.* 1 juin 2001;69(6):4109-15.
154. Harper M, Boyce JD, Cox AD, Michael FS, Wilkie IW, Blackall PJ, et al. *Pasteurella multocida* Expresses Two Lipopolysaccharide Glycoforms Simultaneously, but Only a Single Form Is Required for Virulence: Identification of Two Acceptor-Specific Heptosyl I Transferases. *Infect Immun.* 1 août 2007;75(8):3885-93.
155. Harper M, St Michael F, John M, Vinogradov E, Adler B, Boyce JD, et al. *Pasteurella multocida* Heddleston serovars 1 and 14 express different lipopolysaccharide structures but share the same lipopolysaccharide biosynthesis outer core locus. *Vet Microbiol.* 2 juin 2011;150(3-4):289-96.
156. Harper M, Cox AD, Michael FS, Wilkie IW, Boyce JD, Adler B. A Heptosyltransferase Mutant of *Pasteurella multocida* Produces a Truncated Lipopolysaccharide Structure and Is Attenuated in Virulence. *Infect Immun.* 1 juin 2004;72(6):3436-43.
157. Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M, et al. Role of Capsule in the Pathogenesis of Fowl Cholera Caused by *Pasteurella multocida* Serogroup A. *Infect Immun.* 1 avr 2001;69(4):2487-92.
158. Boyce JD, Adler B. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun.* 1 juin 2000;68(6):3463-8.
159. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 29 juill 2010;144(1-2):1-17.
160. Dabo SM, Confer AW, Hartson SD. Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Vet Microbiol.* 31 oct 2005;110(3-4):265-75.
161. Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in P.

- multocida interaction with extracellular matrix molecules. *Microb Pathog.* oct 2003;35(4):147-57.
162. Pullinger GD, Bevir T, Lax AJ. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol Microbiol.* 1 janv 2004;51(1):255-69.
163. Wilson BA, Ho M. Cellular and molecular action of the mitogenic protein-deamidating toxin from *Pasteurella multocida*. *FEBS J.* déc 2011;278(23):4616-32.
164. Preuß I, Hildebrand D, Orth JHC, Aktories K, Kubatzky KF. *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. *Cell Microbiol.* 1 août 2010;12(8):1174-85.
165. Pattison IH, Howell DG, Elliot J. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J Comp Pathol.* oct 1957;67(4):320-30.
166. Bertschinger HU, Seifert P. Isolation of *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumonia. In Zagreb, Yugoslavia.; 1978.
167. Shope RE. PORCINE CONTAGIOUS PLEURO-PNEUMONIA : I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION, ETIOLOGY, AND PATHOLOGY. *J Exp Med.* 29 févr 1964;119(3):357.
168. POHL S, BERTSCHINGER HU, FREDERIKSEN W, MANNHEIM W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1983;33(3):510-4.
169. Matthews PR, Pattison IH. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *J Comp Pathol.* janv 1961;71:44-52.
170. Niven DF, Levesque M. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int J Syst Evol Microbiol.* 1988;38(3):319-320.
171. Blackall PJ, Klaasen HLBM, Van Den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol.* 3 janv 2002;84(1-2):47-52.
172. Perry MB, Altman E, Brisson J-R, Beynon LM, Richards JC. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains. *Serodiagn Immunother Infect Dis.* 1 août 1990;4(4):299-308.
173. Grasteau A. Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [Université de Montréal]; 2011.
174. RYCROFT AN, GARSIDE LH. *Actinobacillus* Species and their Role in Animal Disease. *Vet J.* 1 janv 2000;159(1):18-36.
175. Negrete-Abascal E, Reyes ME, García RM, Vaca S, Girón JA, García O, et al. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol.* 15 janv 2003;185(2):664-8.
176. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* févr 2002;4(2):225-35.
177. Torremorell M, Pijoan C, Janni K, Walker R, Joo HS. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am J Vet Res.* août 1997;58(8):828-32.
178. Jobert JL, Savoye C, Cariolet R, Kobisch M, Madec F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *Can J Vet Res.* janv



2000;64(1):21.

179. Rogers R, Eaves L, Blackall P, Truman K. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) pleuropneumoniae. *Aust Vet J.* 1 janv 1990;67(1):9-12.
180. Hensel A, Windt H, Stockhofe-Zurwieden N, Lödding H, Koch W, Petzoldt K. A Porcine Aerosol Infection Model for Studying Dose Dependent Effects Caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* Bacteria. *J Aerosol Med.* 1 janv 1993;6(2):73-88.
181. Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Vet Med Sci.* avr 1996;58(4):297-303.
182. Bertram TA. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol.* nov 1985;22(6):598-609.
183. Jacques M, Foiry B, Higgins R, Mittal KR. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol.* juill 1988;170(7):3314.
184. Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP, Anderson P. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) pleuropneumoniae serotype 5. *Infect Immun.* août 1988;56(8):1880-9.
185. Utrera V, Pijoan C. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet Rec.* 13 avr 1991;128(15):357-8.
186. Boekema BKHL, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP, Verheijden JH. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet Microbiol.* 19 mai 2003;93(2):133-44.
187. Ramjeet M, Deslandes V, Michael FS, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, et al. Truncation of the Lipopolysaccharide Outer Core Affects Susceptibility to Antimicrobial Peptides and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1. *J Biol Chem.* 25 nov 2005;280(47):39104-14.
188. Chung JW, Ng-Thow-Hing C, Budman LI, Gibbs BF, Nash JHE, Jacques M, et al. Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *PROTEOMICS.* 1 juin 2007;7(11):1854-65.
189. Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res.* sept 2010;41(5):65.
190. Bélanger M, Bégin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun.* 1 févr 1995;63(2):656-62.
191. Deslandes V, Nash JH, Harel J, Coulton JW, Jacques M. Transcriptional profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under iron-restricted conditions. *BMC Genomics.* 2007;8(1):72.
192. Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol.* août 1993;139(8):1723-8.
193. Frey J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 1 juill 1995;3(7):257-61.
194. Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, et al. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* 1999;145(8):2105-16.
195. Lone AG, Deslandes V, Nash JHE, Jacques M, MacInnes JI. Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS*

One. 3 juill 2009;4(7):e6139.

196. Liu J, Chen X, Tan C, Guo Y, Chen Y, Fu S, et al. In vivo induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol.* 12 juin 2009;137(3-4):282-9.
197. Fenwick BW, Osburn BI. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect Immun.* nov 1986;54(2):575-82.
198. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 1992;29(3):245-77.
199. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2000;44(9):2242-6.
200. Sanchez-Pescador R, Brown JT, Roberts M, Urdea MS. Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance. *Nucleic Acids Res.* 11 févr 1988;16(3):1218.
201. Trieber CA, Burkhardt N, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biol Chem.* juill 1998;379(7):847-55.
202. Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci.* 1 avr 2002;72(2):87-93.
203. Leclercq R, Courvalin P. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1991;35(7):1273.
204. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1991;35(7):1267.
205. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a Plasmid-Borne Chloramphenicol-Florfenicol Resistance Gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2000;44(9):2530-3.
206. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 1 août 2005;57(4):1064-73.
207. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juill 2006;50(7):2500-5.
208. Meier A, Kirschner P, Springer B, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, et al. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 1994;38(2):381.
209. Stone GG, Shortridge D, Flamm RK, Versalovic J, Beyer J, Idler K, et al. Identification of a 23S rRNA Gene Mutation in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 1 déc 1996;1(4):227-8.
210. Mamelli L, Prouzet-Mauléon V, Pagès J-M, Mégraud F, Bolla J-M. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *J Antimicrob Chemother.* sept 2005;56(3):491-7.
211. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 1999;43(12):2823.
212. Fontana R, Ligozzi M, Pittaluga F, Satta G. Intrinsic penicillin resistance in

- enterococci. *Microb Drug Resist* Larchmt N. 1996;2(2):209-13.
213. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis*. mars 1999;179 Suppl 2:S353-359.
214. Jeanteur D, Schirmer T, Fourel D, Simonet V, Rummel G, Widmer C, et al. Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 oct 1994;91(22):10675-9.
215. Goldberg E, Bishara J. Contemporary unconventional clinical use of cotrimoxazole. *Clin Microbiol Infect*. janv 2012;18(1):8-17.
216. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res*. mai 2001;32(3/4):261-73.
217. Rådström P, Swedberg G, Sköld O. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 sept 1991;35(9):1840-8.
218. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 févr 1995;39(2):279-89.
219. Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LSL, Jackson CA, Skurray RA. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol*. 1 févr 1989;3(2):161-75.
220. Flensburg J, Sköld O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *Eur J Biochem*. 1 févr 1987;162(3):473-6.
221. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*. 1 févr 1999;2(1):38-55.
222. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents*. mai 2005;25(5):358-73.
223. Piddock LJV, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ. Evidence for an Efflux Pump Mediating Multiple Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 nov 2000;44(11):3118-21.
224. Poole K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2000;44(10):2595-9.
225. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*. janv 2009;2(1):40-61.
226. Poulidakos P, Falagas ME. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opin Pharmacother*. août 2013;14(12):1585-97.
227. Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*. 1 juin 1997;5(6):234-40.
228. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1 mars 1993;57(1):138-63.
229. Chaslus-Dancla E, Glupczynski Y, Gerbaud G, Lagorce M, Lafont JP, Courvalin P. Detection of apramycin resistant Enterobacteriaceae in hospital isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 15 oct 1989;52(3):261-5.
230. Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P. Involvement of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 nov 1999;43(11):2624-8.

231. Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* Is an Aminoglycoside Efflux Pump. *J Bacteriol.* 15 mars 2000;182(6):1754-6.
232. Cannon M, Harford S, Davies J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 1990;26(3):307-17.
233. Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 1997;41(1):1-6.
234. Lovett PS. Translational attenuation as the regulator of inducible cat genes. *J Bacteriol.* 1 janv 1990;172(1):1-6.
235. Pradel E, Pagès J-M. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2002;46(8):2640-3.
236. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* avr 2001;3(2):255-64.
237. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 1 déc 1996;60(4):575-608.
238. Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 1 mai 2005;55(5):776-9.
239. Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006;2(1):e7.
240. Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *J Antimicrob Chemother.* 1 févr 2007;59(2):191-6.
241. Cloeckaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel J-L, et al. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the floR Gene in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 oct 2000;44(10):2858-60.
242. White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, et al. Characterization of Chloramphenicol and Florfenicol Resistance in *Escherichia coli* Associated with Bovine Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1 déc 2000;38(12):4593-8.
243. Arcangioli MA, Leroy-Sétrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 15 mai 1999;174(2):327-32.
244. Kehrenberg C, Schwarz S. fexA, a Novel *Staphylococcus lentus* Gene Encoding Resistance to Florfenicol and Chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 févr 2004;48(2):615-8.
245. Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS. Novel Florfenicol and Chloramphenicol Resistance Gene Discovered in Alaskan Soil by Using Functional Metagenomics. *Appl Environ Microbiol.* 1 août 2010;76(15):5321-6.
246. Tao W, Lee MH, Wu J, Kim NH, Kim J-C, Chung E, et al. Inactivation of Chloramphenicol and Florfenicol by a Novel Chloramphenicol Hydrolase. *Appl Environ Microbiol.* 1 sept 2012;78(17):6295-301.
247. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med.* 7 juin 1985;78(6A):3-21.
248. Thiolas A, Bornet C, Davin-Régli A, Pagès J-M, Bollet C. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftiofime associated with mutation in Omp36 osmoporin of

- Enterobacter aerogenes. *Biochem Biophys Res Commun*. 7 mai 2004;317(3):851-6.
249. Philippe N, Maigre L, Santini S, Pinet E, Claverie J-M, Davin-Régli A-V, et al. In Vivo Evolution of Bacterial Resistance in Two Cases of *Enterobacter aerogenes* Infections during Treatment with Imipenem. *PLOS ONE*. 23 sept 2015;10(9):e0138828.
250. Chen DZ, Patel DV, Hackbarth CJ, Wang W, Dreyer G, Young DC, et al. Actinonin, a Naturally Occurring Antibacterial Agent, Is a Potent Deformylase Inhibitor. *Biochemistry (Mosc)*. 1 févr 2000;39(6):1256-62.
251. Giglione C, Pierre M, Meinnel T. Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol*. juin 2000;36(6):1197-205.
252. Stokes NR, Sievers J, Barker S, Bennett JM, Brown DR, Collins I, et al. Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem*. 2 déc 2005;280(48):39709-15.
253. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. janv 2007;6(1):29-40.
254. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski L da S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 [cité 28 oct 2016];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00353/abstract>
255. Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci*. 1 nov 2002;23(11):494-6.
256. Lohner K, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 15 déc 1999;1462(1-2):141-56.
257. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. mars 2005;3(3):238-50.
258. Fritz JH, Brunner S, Birnstiel ML, Buschle M, Gabain A v, Mattner F, et al. The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. *Vaccine*. 3 sept 2004;22(25-26):3274-84.
259. Peschel A, Sahl H-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol*. juill 2006;4(7):529-36.
260. Dorner F, Lienkamp K. CHAPTER 5: Polymer-Based Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides (SMAMPs) – A New Class of Nature-Inspired Antimicrobial Agents with Low Bacterial Resistance Formation Potential. In 2013 [cité 29 oct 2016]. p. 97-138. Disponible sur: <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849738071-00097/978-1-84973-807-1>
261. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. déc 2006;24(12):1551-7.
262. Tew GN, Scott RW, Klein ML, DeGrado WF. De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications. *Acc Chem Res*. 19 janv 2010;43(1):30-9.
263. Sabouri Ghannad M, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iran J Basic Med Sci*. mars 2012;15(2):693-701.
264. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and

- bacteriophages. *Poult Sci.* 1 avr 2003;82(4):640-7.
265. Mathur MD, Vidhani S, Mehndiratta PL. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *J Assoc Physicians India.* juin 2003;51:593-6.
266. Inal JM. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):237-44.
267. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother.* 1 janv 2005;11(5):211-9.
268. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: Facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* 15 févr 2006;296(1):5-14.
269. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. Fox D, éditeur. *PLoS ONE.* 29 août 2007;2(8):e799.
270. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* déc 2008;81(4):591-606.
271. Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res.* oct 2016;191:51-80.
272. Dabour N, Zihler A, Kheadr E, Lacroix C, Fliss I. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 15 août 2009;133(3):225-33.
273. Lohans CT, Vederas JC. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. *Int J Microbiol.* 2012;2012:1-13.
274. Nishie M, Nagao J-I, Sonomoto K. Antibacterial peptides « bacteriocins »: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* mars 2012;17(1):1-16.
275. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 2012;25(3):450-70.
276. Worthington RJ, Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* mars 2013;31(3):177-84.
277. Wu P, Grainger DW. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials.* avr 2006;27(11):2450-67.
278. Lane D. Designer combination therapy for cancer. *Nat Biotechnol.* févr 2006;24(2):163-4.
279. Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature.* 19 avr 2001;410(6831):995-1001.
280. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 nov 2014;78:14-27.
281. Gill EE, Franco OL, Hancock REW. Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug-Resistant Pathogens. *Chem Biol Drug Des.* janv 2015;85(1):56-78.
282. Högberg LD, Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci.* nov 2010;31(11):509-15.
283. Tay S, Yew W. Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Int J Mol Sci.* 9 août 2013;14(8):16570-99.
284. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol.* janv 2008;6(1):17-27.
285. Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Antimicrob*

- Resist Chemother. 2013;4:114.
286. Cirioni O, Mocchegiani F, Cacciatore I, Vecchiet J, Silvestri C, Baldassarre L, et al. Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection. *Peptides*. févr 2013;40:77-81.
287. Gerdt JP, Blackwell HE. Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chem Biol*. 17 oct 2014;9(10):2291-9.
288. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*. nov 2006;4(11):811-25.
289. Gauthier A, Robertson ML, Lowden M, Ibarra JA, Puente JL, Finlay BB. Transcriptional Inhibitor of Virulence Factors in Enteropathogenic Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 oct 2005;49(10):4101-9.
290. Swietnicki W, Carmany D, Retford M, Guelta M, Dorsey R, Bozue J, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Yersinia pestis Type III secretion system YscN ATPase. *PloS One*. 2011;6(5):e19716.
291. Marshall NC, Finlay BB. Targeting the type III secretion system to treat bacterial infections. *Expert Opin Ther Targets*. 1 févr 2014;18(2):137-52.
292. Linington RG, Robertson M, Gauthier A, Finlay BB, van Soest R, Andersen RJ. Caminoside A, an antimicrobial glycolipid isolated from the marine sponge Caminus sphaeroconia. *Org Lett*. 14 nov 2002;4(23):4089-92.
293. Harshey RM. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):249-73.
294. Mattick JS. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56(1):289-314.
295. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 juin 2005;102(26):9247-52.
296. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1318-22.
297. Malapaka VRR, Barrese AA, Tripp BC, Tripp BC. High-Throughput Screening for Antimicrobial Compounds Using a 96-Well Format Bacterial Motility Absorbance Assay. *J Biomol Screen*. 1 sept 2007;12(6):849-54.
298. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol*. juin 2011;7(6):348-50.
299. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol*. juin 2011;7(6):348-50.
300. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. déc 2005;87(12):1137-47.
301. Van Bambeke F, Pages J-M, Lee VJ. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc*. 1 juin 2006;1(2):157-75.
302. Pagès J-M, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med*. août 2005;11(8):382-9.
303. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV, Pagès J-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother*. 1 juin 2007;59(6):1223-9.

304. Lewis K. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J Mol Microbiol Biotechnol.* avr 2001;3(2):247-54.
305. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol.* 30 mars 2006;71(7):910-8.
306. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1999;43(6):1340-6.
307. Singh R, Swick MC, Ledesma KR, Yang Z, Hu M, Zechiedrich L, et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2012;56(4):1680-5.
308. Ughachukwu P, Unekwe P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res.* juill 2012;2(2):191-8.
309. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2001;45(1):105-16.
310. Renau TE, Léger R, Filonova L, Flamme EM, Wang M, Yen R, et al. Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 18 août 2003;13(16):2755-8.
311. Thorarensen A, Presley-Bodnar AL, Marotti KR, Boyle TP, Heckaman CL, Bohanon MJ, et al. 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 23 juill 2001;11(14):1903-6.
312. Bohnert JA, Kern WV. Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2005;49(2):849.
313. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PloS One.* 2013;8(3):e60666.
314. Handzlik J, Szymańska E, Alibert S, Chevalier J, Otrębska E, Pękala E, et al. Search for new tools to combat Gram-negative resistant bacteria among amine derivatives of 5-arylidenehydantoin. *Bioorg Med Chem.* 1 janv 2013;21(1):135-45.
315. Otrębska-Machaj E, Chevalier J, Handzlik J, Szymańska E, Schabikowski J, Boyer G, et al. Efflux Pump Blockers in Gram-Negative Bacteria: The New Generation of Hydantoin Based-Modulators to Improve Antibiotic Activity. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cité 14 nov 2016];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00622/abstract>
316. Pagès J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* mai 2009;1794(5):826-33.
317. Chevalier J, Mahamoud A, Baitiche M, Adam E, Viveiros M, Smarandache A, et al. Quinazoline derivatives are efficient chemosensitizers of antibiotic activity in *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains. *Int J Antimicrob Agents.* août 2010;36(2):164-8.
318. Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2003;47(2):719.
319. Chan YY, Ong YM, Chua KL. Synergistic interaction between phenothiazines



- and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2007;51(2):623-30.
320. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2002;46(10):3133-41.
321. Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin 2007;59(6):1247-60.
322. Schmitz FJ, Fluit AC, Lückefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhoef J, et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparflaxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1 déc 1998;42(6):807-10.
323. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the in-vitro susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 1997;40(3):458-60.
324. Ohene-Agyei T, Mowla R, Rahman T, Venter H. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *MicrobiologyOpen.* déc 2014;3(6):885-96.
325. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pages J-M, Amaral L, et al. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):2209-11.
326. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine.* nov 2009;16(11):997-1005.
327. Opperman TJ, Kwasny SM, Kim H-S, Nguyen ST, Houseweart C, D'Souza S, et al. Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2014;58(2):722.
328. Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [cité 14 nov 2016];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4419859/>
329. Hancock RE, Wong PG. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1984;26(1):48-52.
330. Hancock RE. Peptide antibiotics. *The Lancet.* 8 févr 1997;349(9049):418-22.
331. Scott MG, Yan H, Hancock RE. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Infect Immun.* avr 1999;67(4):2005-9.
332. Savage PB. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of Gram-negative bacteria. *Ann Med.* 1 janv 2001;33(3):167-71.
333. Vaara M, Vaara T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1983;24(1):107.
334. Morris CM, George A, Wilson WW, Champlin FR. Effect of polymyxin B nonapeptide on daptomycin permeability and cell surface properties in *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Pasteurella multocida*. *J Antibiot (Tokyo).* janv 1995;48(1):67-72.
335. Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T. Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2004;24(1):67-71.
336. Kwon DH, Lu C-D. Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mai 2006;50(5):1623-7.

337. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin Infect Dis*. 1 juin 2002;34(Supplement 3):S93-106.
338. Blanchet M, Borselli D, Brunel JM. Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria? *Future Med Chem*. juin 2016;8(9):963-73.
339. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*. mars 1985;49(1):81-99.
340. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 mai 2000;271(3):559-64.
341. Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Makinoshima H, et al. A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon. *J Biol Chem*. 29 oct 2004;279(44):46008-13.
342. Hafner EW, Tabor CW, Tabor H. Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *J Biol Chem*. 25 déc 1979;254(24):12419-26.
343. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J*. 15 déc 1999;344(3):633-42.
344. Seiler N, Raul F. Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med*. 1 juill 2005;9(3):623-42.
345. Estrada G, Villegas E, Corzo G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat Prod Rep*. 31 janv 2007;24(1):145-61.
346. Ralton L, Bestwick CS, Thoo Lin PK. Polyamine Analogues and Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Curr Bioact Compd*. 1 sept 2007;3(3):179-91.
347. Senanayake MDT, Amunugama H, Boncher TD, Casero RA, Jr, Woster PM. Design of polyamine-based therapeutic agents: new targets and new directions. *Essays Biochem*. 46:77.
348. Vega ALD, Delcour AH. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol*. juill 1996;178(13):3715.
349. Kwon DH, Lu C-D. Polyamines Induce Resistance to Cationic Peptide, Aminoglycoside, and Quinolone Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2006;50(5):1615.
350. Liu N, Benedik MJ, Delcour AH. Disruption of polyamine modulation by a single amino acid substitution on the L3 loop of the OmpC porin channel. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 12 juin 1997;1326(2):201-12.
351. Katsu T, Nakagawa H, Yasuda K. Interaction between Polyamines and Bacterial Outer Membranes as Investigated with Ion-Selective Electrodes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 avr 2002;46(4):1073-9.
352. Siala W, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Hallin M, Denis O, Bambeke FV. Comparison of the Antibiotic Activities of Daptomycin, Vancomycin, and the Investigational Fluoroquinolone Delafloxacin against Biofilms from *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2014;58(11):6385.
353. Hobley L, Kim SH, Maezato Y, Wyllie S, Fairlamb AH, Stanley-Wall NR, et al. Norspermidine Is Not a Self-Produced Trigger for Biofilm Disassembly. *Cell*. 13 févr 2014;156(4):844-54.
354. Brunel JM, Lieutaud A, Lome V, Pagès J-M, Bolla J-M. Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem*. 1 mars 2013;21(5):1174-9.
355. Salmi C, Loncle C, Vidal N, Letourneux Y, Fantini J, Maresca M, et al.

- Squalamine: An Appropriate Strategy against the Emergence of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria? PLoS ONE [Internet]. 2008 [cité 14 nov 2016];3(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC2447875/>
356. Xu M, Davis RA, Feng Y, Sykes ML, Shelper T, Avery VM, et al. Ianthelliformisamines A–C, Antibacterial Bromotyrosine-Derived Metabolites from the Marine Sponge *Suberea ianthelliformis*. *J Nat Prod*. 25 mai 2012;75(5):1001–5.
357. Muth A, Pandey V, Kaur N, Wason M, Baker C, Han X, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Antimetastatic Agents Predicated upon Dihydromotuporamine C and Its Carbocyclic Derivatives. *J Med Chem*. 22 mai 2014;57(10):4023–34.
358. Berti L, Bolla JM, Brunel JM, Casanova J, Lorenzi V. Use of PolyaminoMisoprenyl in antibiotic or antiseptic treatment. EP11305193.2.
359. Mamelli L, Petit S, Chevalier J, Giglione C, Lieutaud A, Meinnel T, et al. New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors. *PloS One*. 30 juill 2009;4(7):e6443.
360. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 1995;39(9):1948–53.
361. Jennings MC, Minbiole KPC, Wuest WM. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect Dis*. 10 juill 2015;1(7):288–303.
362. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 24 janv 2002;415(6870):389–95.
363. Djouhri-Bouktab L, Rolain JM, Brune JM. Mini-Review: Polyamines Metabolism, Toxicity and Potent Therapeutical Use. *Anti-Infective Agents*. 2013;(2211–3525/13).
364. Williams DE, Lassota P, Andersen RJ. Motuporamines A–C, Cytotoxic Alkaloids Isolated from the Marine Sponge *Xestospongia exigua* (Kirkpatrick). *J Org Chem*. 1 juill 1998;63(14):4838–41.
365. Roskelley CD, Williams DE, McHardy LM, Leong KG, Troussard A, Karsan A, et al. Inhibition of Tumor Cell Invasion and Angiogenesis by Motuporamines. *Cancer Res*. 15 sept 2001;61(18):6788–94.
366. Muth A, Madan M, Archer JJ, Ocampo N, Rodriguez L, Phanstiel O. Polyamine Transport Inhibitors: Design, Synthesis, and Combination Therapies with Difluoromethylornithine. *J Med Chem*. 23 janv 2014;57(2):348–63.
367. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol*. juin 2011;14(3):236–43.
368. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. févr 2013;13(2):155–65.
369. Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect*. août 2013;121(8):878–85.
370. European Medical Agency. Fifth ESVAC Report: Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013 [Internet]. 2015 oct. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf)
371. Chauvin C, Beloeil P-A, Orand J-P, Sanders P, Madec F. A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France. *Prev Vet Med*. 30 sept

2002;55(2):109-20.

372. Prüller S, Rensch U, Meemken D, Kaspar H, Kopp PA, Klein G, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* Isolates from Swine and Companion Animals and Detection of Resistance Genes. PLOS ONE. août 2015;10(8):e0135703.
373. Briyne ND, Atkinson J, Borriello SP, Pokludová L. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. Vet Rec. 4 oct 2014;175(13):325-325.
374. Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. Trends Microbiol. sept 2014;22(9):536-45.
375. Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. Chemosphere. févr 2016;144:2290-301.
376. Collignon PC, Conly JM, Andremont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, World Health Organization Advisory Group, Bogotá Meeting on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (WHO-AGISAR). World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 oct 2016;63(8):1087-93.
377. Kadlec K, Kehrenberg C, Wallmann J, Schwarz S. Antimicrobial Susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* Isolates from Porcine Respiratory Tract Infections. Antimicrob Agents Chemother. 1 déc 2004;48(12):4903-6.
378. Borselli D, Lieutaud A, Thefenne H, Garnotel E, Pagès J-M, Brunel JM, et al. Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro. PLOS ONE. mai 2016;11(5):e0154490.
379. Bolla J, Brunel J, Casanova J, Lorenzi V, Berti L. Preparation of polyaminoisoprenyl derivatives for use in medical and nonmedical antibiotic or antiseptic treatment.
380. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. juill 2003;52(1):1.
381. Murray TS, Kazmierczak BI. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. oct 2006;188(19):6995-7004.
382. CORBIERES PRIOT L. SENSIBILITE DE BORDETELLA BRONCHISEPTICA AUX ANTIBIOTIQUES (ETUDE DE 80 SOUCHES) (DES BIOL. MED.) [Thèse d'exercice]. [France]; 1996.
383. Mamelli L, Demoulin E, Prouzet-Mauléon V, Mégraud F, Pagès J-M, Bolla J-M. Prevalence of efflux activity in low-level macrolide-resistant *Campylobacter* species. J Antimicrob Chemother. févr 2007;59(2):327-8.
384. Ghisalberti D, Masi M, Pagès J-M, Chevalier J. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. Biochem Biophys Res Commun. 25 mars 2005;328(4):1113-8.
385. Hay T, Fraud S, Lau CH-F, Gilmour C, Poole K. Antibiotic Inducibility of the mexXY Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the MexZ Anti-Repressor ArmZ. PLoS ONE [Internet]. 2013 [cité 17 mars 2017];8(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC3575510/>
386. Bohnert JA, Schuster S, Szymaniak-Vits M, Kern WV. Determination of Real-Time Efflux Phenotypes in *Escherichia coli* AcrB Binding Pocket Phenylalanine Mutants Using a 1,2'-Dinaphthylamine Efflux Assay. PLOS ONE. juin 2011;6(6):e21196.
387. Andrade BGN, Marin MFA, Cambuy DD, Fonseca EL, Souza NF, Vicente ACP. Complete genome sequence of a clinical *Bordetella pertussis* isolate from Brazil. Mem

Inst Oswaldo Cruz. nov 2014;109(7):972-4.

388. White PA, Stokes HW, Bunny KL, Hall RM. Characterisation of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 1 juin 1999;175(1):27-35.

389. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. Nat Rev Microbiol. janv 2011;9(1):62-75.

390. Hawkey PM. Pre-clinical experience with daptomycin. J Antimicrob Chemother. nov 2008;62 Suppl 3:iii7-14.

391. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. Dev Cell. oct 2002;3(4):593-603.

392. Schobert M, Tielen P. Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of *Pseudomonas aeruginosa*. Future Microbiol. 30 mars 2010;5(4):603-21.

393. Boshoff HIM, Barry CE. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. Nat Rev Microbiol. janv 2005;3(1):70-80.

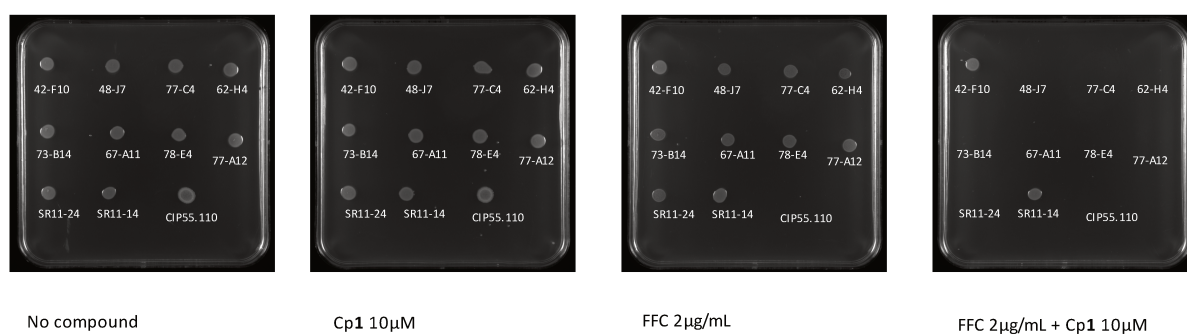
394. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2 nov 2011;9(12):894-6.

395. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Med Chem. 2014;6:25-64.

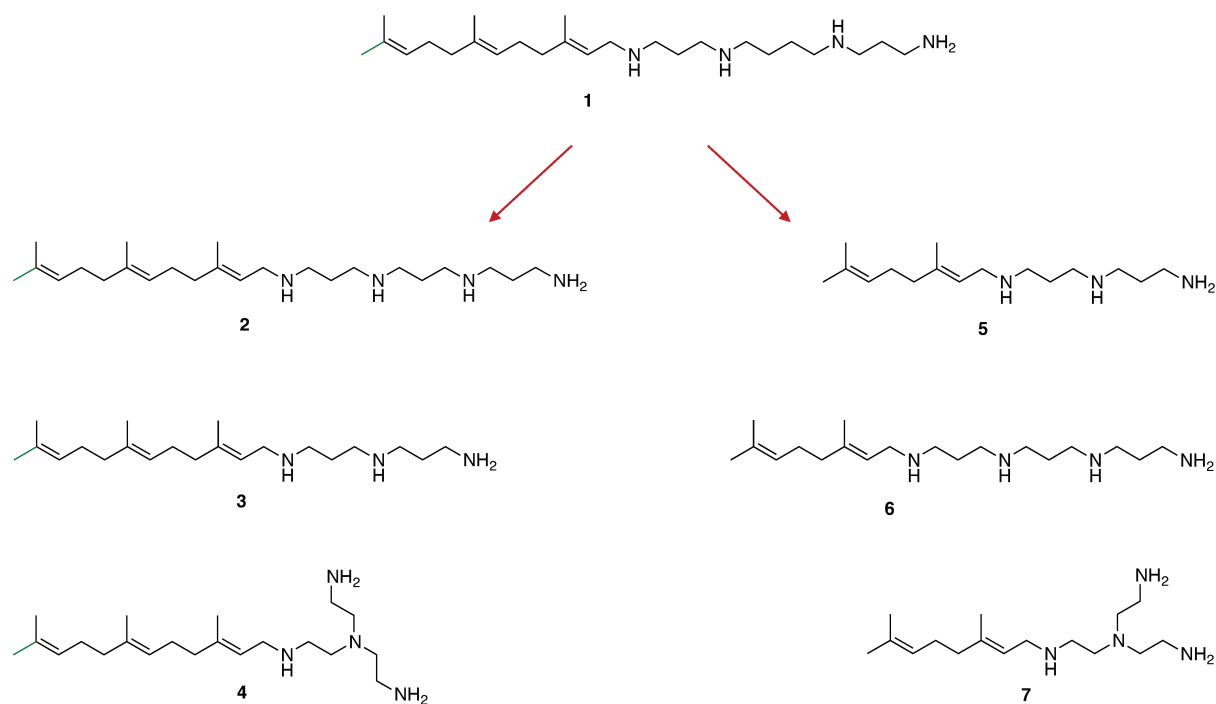
## Figures

Strains	Source	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			MIC ( $\mu\text{M}$ )				
		FFC	Cp1	Cp2	Cp3	Cp4	Cp5	Cp6	Cp7
CIP55.110	Pasteur Institute	4	187,5	50	50	50	>750	>750	375
42-F10	Labofarm	8	187,5	50	50	50	>750	>750	375
48-J7	Labofarm	4	187,5	50	100	50	>750	>750	375
77-C4	Labofarm	4	187,5	50	100	100	>750	>750	375
62-H4	Labofarm	4	187,5	50	50	50	>750	>750	375
73-B14	Labofarm	2	187,5	50	100	100	>750	>750	375
67-A11	Labofarm	4	187,5	50	100	50	>750	>750	375
78-E4	Labofarm	4	187,5	50	100	50	>750	>750	375
77-A12	Labofarm	4	187,5	50	100	50	>750	>750	375
SR11-24	Labofarm	2	187,5	50	50	50	>750	>750	375
SR11-14	Labofarm	32	187,5	50	50	50	>750	>750	375

**Table 1:** Strains used in this study and their susceptibilities to florfenicol (FFC) and some of polyamines derivatives (hit compound and its derivatives).



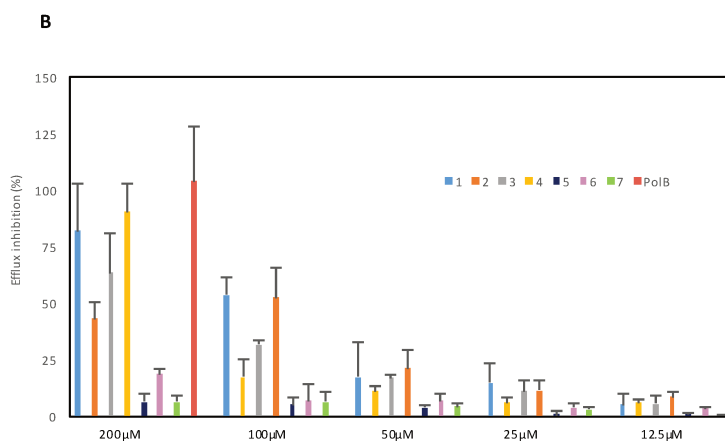
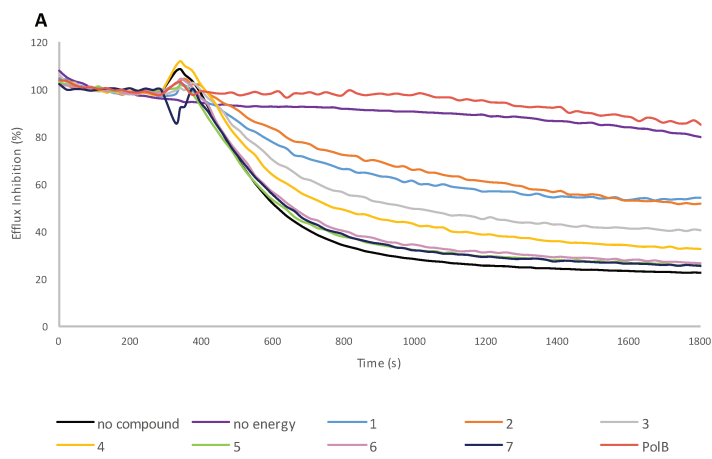
**Figure 1:** Compound 1 activity against *B. bronchiseptica* reference strain, CIP55.110. The ability of bacteria to grow under various conditions was assessed in solid media containing, (left to right) no compound, 10 $\mu\text{M}$  Cp1, 2 $\mu\text{g/mL}$  FFC, a combination of 2 $\mu\text{g/mL}$  FFC and 10 $\mu\text{M}$  Cp1. 5 $\mu\text{L}$  of  $5 \cdot 10^5$  CFU of each strain were spotted on the plates.



**Figure 2: Structure of new derivatives.** Farnesyl derivatives Cp2-Cp4 and geranyl derivatives Cp5-Cp7

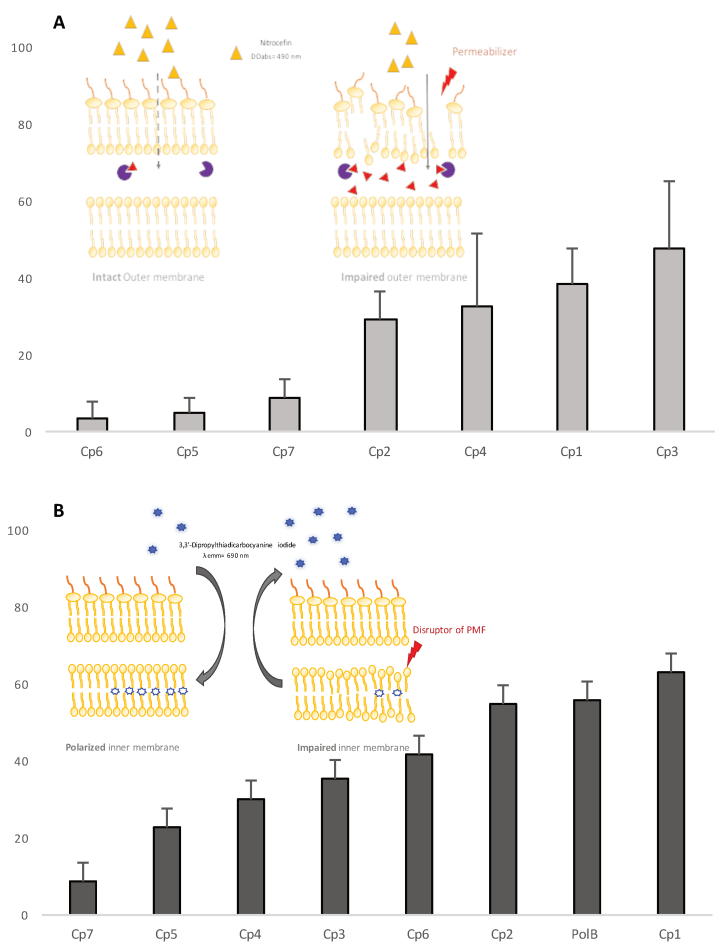
	Cp1		Cp2		Cp3		Cp4		Cp5		Cp6		Cp7	
	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4	CMI/2	CMI/4
CIP 55.110	0,50	0,29	0,56	0,75	0,56	0,50	0,63	0,38	0,53	ND	0,50	ND	0,53	ND
42-F10	0,51	ND	0,56	1,25	0,53	0,75	0,63	0,75	0,63	ND	0,57	ND	0,63	ND
48-J7	0,54	0,33	0,75	1,25	0,63	0,75	1,00	1,25	0,77	ND	0,63	ND	0,63	ND
77-C4	0,52	ND	0,56	0,75	0,53	1,25	0,63	1,25	0,57	ND	0,52	ND	0,57	ND
62-H4	0,54	ND	1,00	0,50	0,75	1,25	0,75	1,25	0,77	ND	ND	ND	ND	ND
73-B14	0,51	ND	0,63	0,75	0,53	0,75	0,63	1,25	ND	ND	0,63	ND	ND	ND
67-A11	0,50	0,26	0,53	0,50	0,52	0,38	0,53	0,50	0,63	ND	0,50	0,28	0,57	ND
78-E4	0,51	ND	0,75	0,25	0,52	0,75	0,53	0,50	0,51	0,38	0,50	0,38	0,57	ND
77-A12	0,50	0,26	0,53	0,50	0,52	0,50	0,53	0,50	0,52	0,32	0,52	0,32	0,57	ND
SR11-24	0,52	ND	0,75	0,75	0,53	1,25	0,56	0,75	0,63	ND	0,57	ND	0,57	ND
SR11-14	0,51	ND	0,63	0,75	0,56	0,75	1,00	0,75	0,63	ND	0,57	ND	0,57	ND

**Table 2:** FIC index for compound concentration that lead to an antibiotic diminution of 50% and 75%. **ND.** Non determined because the maximal concentration used in the study was insufficient to observe an effect on bacterial growth.

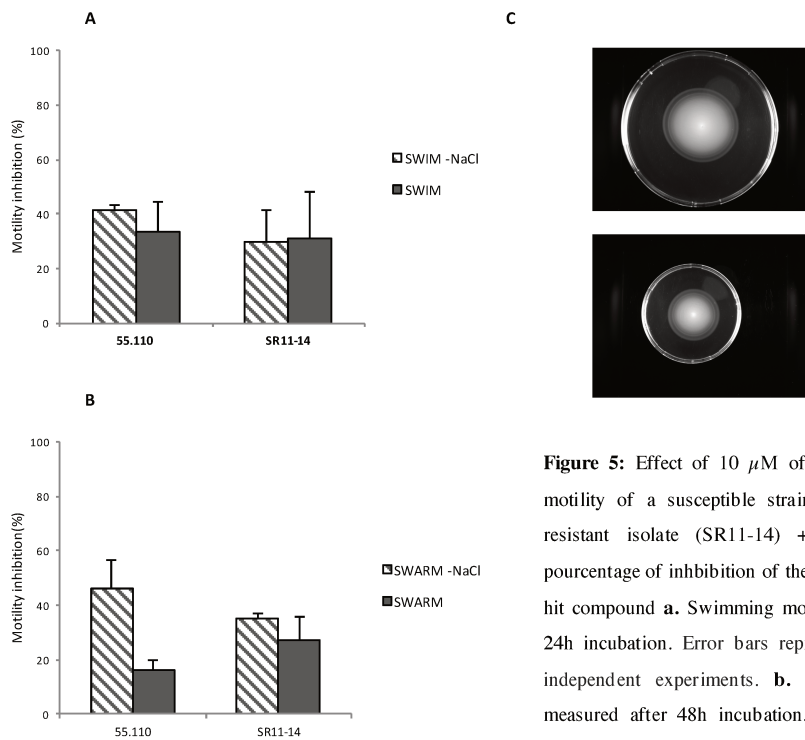


**Figure 3: Inhibition of the efflux of the 1,2' dinaphthylamine dye by the hit compound and its farnesyl and geranyl derivatives. a.** Efflux was triggered after 200s by the addition of culture media. The intensity of fluorescence emission for 1,2' dinaphthylamine is given in relative fluorescence units (RFU). Each compound is tested at 100  $\mu$ M concentration; as controls an experiment without addition of compounds and culture media (purple curve) was also included. **b.** Percent of efflux inhibition obtained for each compound. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments

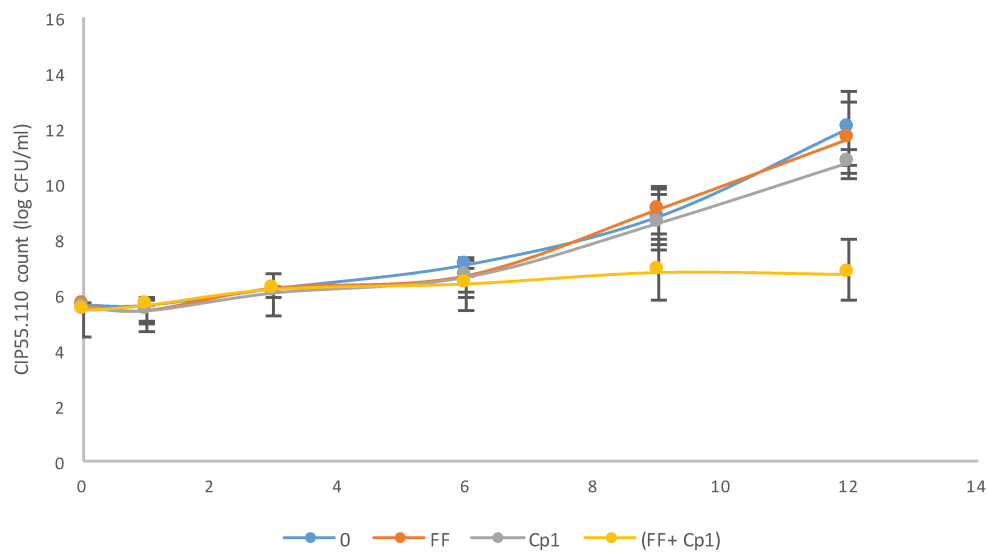




**Figure 4: Effect of polyamine derivatives on membrane functions a. Outer membrane permeabilization** in presence 100  $\mu$ M of compounds. Nitrocefin hydrolysis was followed at 490nm. **b. Inner membrane depolarization** measured by the increase fluorescence of the dye DisC<sub>3</sub>(5) in presence of 100  $\mu$ M of the derivatives. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments.



**Figure 5:** Effect of 10  $\mu$ M of the hit compound on bacterial motility of a susceptible strain(CIP55.110) and a florfenicol resistant isolate (SR11-14) +/-NaCl. Graph represent the pourcentage of inhibition of the motility halo in presence of the hit compound **a**. Swimming motility, halo were measured after 24h incubation. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments. **b**. Swarming motility, halo were measured after 48h incubation. Error bars represent standard deviations of 3 independent experiments **c**. Picture of swimming plate with NaCl containing no compound (high) and 10 $\mu$ M of hit cp (down), inoculated with SR11-14, after 24h incubation.



**Figure 6:** Time-kill curves of FFC, Hit Cp (MIC values) and the combination FFC+ Hit Cp (synergistic concentrations) over a 12 hour period against CIP55.110 bacterial strain. Error bars represent standard deviations of 2 independent experiments

## DISCUSSION ARTICLE 4 :

Bien qu'un premier criblage de la chimiothèque des dérivés polyamino-isopréniques ait été effectué au cours de l'étude sur *P. aeruginosa* (article 2), nous en avons conduit un deuxième dans les mêmes conditions expérimentales, sur *B. bronchiseptica* afin d'identifier le meilleur adjuvant au florfénicol qui nous permettrait d'envisager de traiter les infections respiratoires porcines avec des quantités d'ATB plus faibles. Ainsi, le criblage réalisé a permis d'identifier le même composé hit que chez *P. aeruginosa* (composé **3** dans l'article 2), le composé **1** comme potentiel adjuvant au florfénicol. Néanmoins le test de synergie monodose a révélé que seuls les isolats présentant une bonne sensibilité ou une sensibilité intermédiaire au florfénicol pouvaient être traités par la combinaison FFC / **1**. Après avoir synthétisé 6 dérivés du composé **1** dans une démarche de « hit to lead », les tests de l'échiquier ont révélé que le composé **1** était le plus efficace. L'étude du mode d'action a permis de démontrer la présence d'un efflux actif chez *B. bronchiseptica* car seule la présence putative de pompes RND avait été supposée chez *B. pertussis* par l'étude du génome (387), à l'exception du gène *floR*, qui appartient à la famille des MFS, retrouvé dans l'ADN chromosomique d'isolats de *B. bronchiseptica* résistants à la fois au chloramphénicol et au florfénicol (240).

Nous avons ensuite comparé la capacité du composé **1** et de ses dérivés à inhiber l'efflux. Nous pouvons constater que les dérivés présentant la meilleure capacité à inhiber l'efflux sont les composés possédant un groupement farnésyl, parmi lesquels, le composé **1** et le composé **2** sont les plus efficaces. Comme nous avons pu le montrer dans des études précédentes (article 2 et 3) l'inhibition de l'efflux peut résulter d'une perméabilisation conduisant à une dépolarisation membranaire. Effectivement, les dérivés provoquent une dépolarisation de la membrane interne pouvant aller de 10 à 60% pour une concentration de 100  $\mu$ M en fonction du dérivé considéré. De manière intéressante, on note une corrélation entre l'efficacité de dépolarisation et la présence du groupement farnésyl. En effet, les dérivés possédant un groupe géranyl provoquent une dépolarisation moindre. De plus, cette dépolarisation membranaire peut être reliée à une perméabilisation par les composés possédant le motif farnésyl uniquement, avec des taux de perméabilisation d'environ 40% contre 5% en moyenne pour les dérivés géranylamines. Nous avons donc proposé que la dépolarisation membranaire résultant

des propriétés membranotropes des molécules conduisait à une inhibition des systèmes d'efflux.

De ce constat, nous avons émis l'hypothèse que les composés capables de collapser la FPM, et particulièrement le composé **1**, pourraient également moduler l'activité d'autres paramètres physiologiques dépendants du gradient de protons. *B. bronchiseptica* étant un pathogène mobile, le flagelle est largement impliqué dans les phases initiales de la colonisation du tractus respiratoire des animaux infectés et contribue à l'établissement de l'infection. Nous avons ainsi testé la capacité du composé **1** à inhiber la mobilité du flagelle dont la rotation est assurée par la FPM. Aussi nous avons pu observer que 10  $\mu$ M de composé **1** était suffisant pour inhiber à la fois le swimming et le swarming de la souche sauvage mais également d'un isolat résistant au florfénicol et à la combinaison ATB-adjuvant. Ces résultats corrént que la dépolarisation membranaire causée par le composé est indépendante de l'activité de l'ATB mais également que le composé synergise l'activité de l'ATB et non l'inverse. De plus, l'inhibition de la mobilité par le composé **1** est indépendante du profil de résistance de la souche considérée. En effet, nous obtenons les mêmes taux d'inhibition pour la souche sauvage CIP 55.110 que pour l'isolat résistant au florfénicol, la souche SR11-14, alors que la combinaison du florfénicol et du composé **1** à 10  $\mu$ M ne permet pas de restaurer la sensibilité de la souche. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'utiliser les dérivés polyamino-isopréniques comme **inhibiteur d'efflux** mais également comme **inhibiteur de la virulence bactérienne**.



**ARTICLE 5: REVUE**

**Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria?** Marine Blanchet, Diane Borselli, Jean Michel Brunel. Future Med Chem. **8**(9) :963-73, (juin 2016).

## Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria?

Emergence of multidrug-resistant pathogens was responsible for microbial infections and inefficacy of numerous antimicrobial therapies has induced a need for the research of new classes of antibiotics. In this review, we will focus our interest toward the biological properties of polyamino antimicrobial agents.

First draft submitted: 6 April 2016; Accepted for publication: 15 May 2016;  
Published online: 26 May 2016

**Keywords:** antimicrobial agents • antibiotic enhancers • Gram-negative bacteria • multidrug resistance • polyamines

Each year in the USA, at least 2 million people become infected with bacteria that are resistant to antibiotics and at least 23,000 people die annually as a direct result of these infections. The introduction in the Mid-20th century of efficient antibiotic therapies for infectious diseases has completely modified clinical practices in the development of life-threatening conditions leading to reduce the incidence of death resulting from bacterial infections. However, the rise of antibiotic resistance since few decades has resulted in a very pressing need for the discovery of novel antibiotics or treatment strategies [1]. In this context, numerous active avenues of research ongoing to develop the next generation of antibacterial drugs are under current investigations such as the combination of two active antibacterial agents into one hybrid compound or synthetic peptide mimics [2].

Some strains have become resistant to practically all of the commonly available agents. A notorious case is the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, which is resistant not only to methicillin but usually also to aminoglycosides, macrolides and cyclines. Such strains are also resistant to disinfectants, and can act as a major source

of hospital-acquired infections. An even more serious threat may be the emergence of multidrug-resistant (MDR) Gram-negative pathogens that are a global public health concern as therapeutic options for treating such infections are dwindling. Thus, multidrug resistance in bacteria occurs by the presence of plasmids or transposons, of genes, with each coding for resistance to a specific agent and/or by the action of multidrug efflux pumps, each of which can pump out more than one drug type.

Furthermore, the emergence of 'pan-resistant' Gram-negative strains, notably those belonging to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, occurred more recently, after most major pharmaceutical companies stopped the development of new antibacterial agents. Hence, there are almost no agents that could be used against these strains, in which an outer membrane barrier of low permeability is combined with multitudes of specific resistance mechanisms.

On the basis of such observations, there is a need for the development of new strategies and a revival for the use of neglected polyamino derivatives has emerged as antimicrobial agents able to fight resis-

Marine Blanchet<sup>1,2</sup>,  
Diane Borselli<sup>3</sup>  
& Jean Michel Brunel<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), CNRS, UMR7258;

<sup>2</sup>Institut Paoli Calmettes; Aix-Marseille Université, UM 105, Inserm, U1068, F-13009, Marseille, France

<sup>3</sup>UMR-MD1, Aix-Marseille Université, IRBA, TMCD2, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, France

\*Author for correspondence:

Tel.: 33 689271645  
[bruneljm@yahoo.fr](mailto:bruneljm@yahoo.fr)

**Table 1. Minimum inhibition concentrations of antibiotics to *P. aeruginosa* PAO1 in the presence of polyamines.**

Antibiotic	Without compound	Spd	Spn	Put	Cad
Ampicilline	>1024	64	64	128	128
Aztreonam	4	0.5	0.5	1	0.5
Ceftazidine	2	0.5	0.5	1	0.5
Chloramphenicol	128	32	32	64	64
Nalidixic acid	128	64	64	64	64
Erythromycine	128	128	64	128	128

Compound concentrations were as follows: 20 mM Spd, Put and Cad; 1 mM Spn.  
 Cad: Cadaverine; MIC: Minimum inhibition concentration; Put: Putrescine; Spd: Spermidine; Spn: Spermine.  
 Data taken with permission from [15].

tant Gram-negative bacteria. Polyamines are small aliphatic hydrocarbon molecules with quaternary nitrogen groups that have a net positive charge at physiological pH. During the 60s and 70s polyaminated molecules were identified in all forms of life such as bacteria, fungi, plants and all types of eukaryotic cells. They were described to be critical for all types of cellular proliferation by determining

the metabolic pathways of synthesis and degradation. It is well known that polyamines are ubiquitous compounds with different properties such as growth cell, cellular reparation, gene transcription, protein and nucleic acid synthesis [3]. They have been widely studied for their implication in cancer [4] since among all the envisioned approaches for preventing cancer development, a reduction of intracellular

**Table 2. Structures and antimicrobial activities of meta-substituted benzyl pyridinopolyamine derivatives 1–12.**

$X = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-m}$   
**1, R = R<sub>1</sub>; 3, R = R<sub>3</sub>; 5, R = R<sub>5</sub>**  
**2, R = R<sub>2</sub>; 4, R = R<sub>4</sub>; 6, R = R<sub>6</sub>**

$R_1 = \text{CH}_2\text{Ph}$        $R_4 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{-m}$   
 $R_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F-m}$        $R_5 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCH}_3\text{-m}$   
 $R_3 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{-m}$        $R_6 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3\text{-m}$

$X = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3\text{-m}$   
**7, R = R<sub>1</sub>; 9, R = R<sub>3</sub>; 11, R = R<sub>5</sub>**  
**8, R = R<sub>2</sub>; 10, R = R<sub>4</sub>; 12, R = R<sub>6</sub>**

Compound	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>
<b>1</b>	3–6	3–6	12	1–5	>100	>100	6–12	<12.5
<b>2</b>	3–6	3–6	>100	1–5	>100	>100	12–25	<12.5
<b>3</b>	3–6	3–6	>100	1–5	>100	>100	6–12	<12.5
<b>4</b>	3–6	3–6	>100	1–5	>100	>100	>100	25
<b>5</b>	6–12	3–6	>100	1–5	>100	>100	>100	<12.5
<b>6</b>	6–12	3–6	>100	1–5	>100	>100	>100	>100
<b>7</b>	12–25	6–12	>100	1–5	>100	>100	25–50	>100
<b>8</b>	6–12	3–6	>100	3–6	>100	>100	>100	>100
<b>9</b>	6–12	3–6	>100	1–3	>100	>100	50–100	>100
<b>10</b>	3–6	3–6	>100	1–3	>100	>100	>100	>100
<b>11</b>	6–12	3–6	>100	1–3	>100	>100	>100	>100
<b>12</b>	3–6	6–12	>100	2.5–5	>100	>100	>100	>100

All values are minimum inhibitory concentrations (μg/ml).  
 Data taken with permission from [17].



**Table 3. Determination of IC<sub>50</sub> for chloramphenicol and its polyamino parent derivatives against wild-type and mutant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.**

Compound	MRSA (GRE2272)	<i>S. aureus</i> (WT)	<i>E. coli</i> (A2058G)	<i>E. coli</i> (WT)	<i>E. coli</i> ( $\Delta$ tolC)
CAM	8.0	3.1	15.5	6.2	2.0
13	>200	>200	>200	>200	>200
14	>200	45.3	>100	>100	>100
15	>100	12.7	>150	>150	>100
16	7	4.7	9.4	9.4	19.0
17	>100	13.7	32.3	35.5	42.5

All values are IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M).  
WT: Wild-type.  
Data taken with permission from [18].

polyamines synthesis has been suggested. Structurally, polyamines possess positively charged nitrogen atoms and can serve as electrostatic bridges between negative phosphate charges and others polyanions such as DNA and RNA [3] leading to chromatin and DNA modification occurring preferentially in polyamine-depleted cells. Finally, polyamines play a role in cell proliferation by interacting with phosphoprotein p53 involved in different gene regulation. It is reported that polyamine toxicity at high concentration may be the result of formation of high amounts of hydrogen peroxide during interconversion steps and consequently due to the oxidative stress [3]. Furthermore, polyamine cytotoxicity appears highly correlated with the concentration of formed acrolein [5] in the plasma of chronic renal failure patient. In this case, the level of spermine and spermidine decreased whereas the acrolein concentration increased [6]. Thus the apparent critical influence of polyamines on cell development and survival and their recognition by the polyamine transporters have both led to polyamines being increasingly considered for the design of a range of chemotherapeutic agents [7].

On the other hand, it has been widely demonstrated that polyamines can act as endogenous modulators of outer membrane permeability [8] of bacteria inducing resistance to cationic peptide, aminoglycoside or quinolone antibiotics [9].

Polyamines are old polycationic molecules widely distributed in nature described for very first time in 1677 in seminal fluid [10]. It has been widely demon-

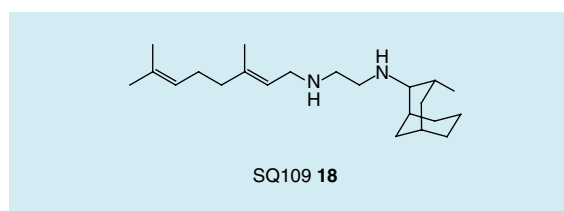
strated that some of them such as cadaverine [11] or spermine [8] could decrease bacteria outer membrane permeability by being natural regulators of porin activity and subsequently reduce bacterial susceptibility to antibiotic treatments [12–14].

Surprisingly, it has been found that polyamines at millimolar levels can increase the susceptibility of *P. aeruginosa* to a variety of antibiotics (Table 1) [15], whereas Vaara *et al.* by using submillimolar concentrations have observed a discrepant outcome [16]. It has appeared that polyamines might be potentially useful in antipseudomonal therapies by increasing the effectiveness of numerous  $\beta$ -lactam antibiotics.

Thus, these results suggested that the development of a new approach involving polyamino derivatives as potent either antimicrobial agents or chemosensitizers of ineffective antibiotics against MDR bacteria.

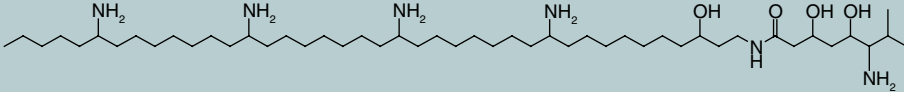
### Development of new polyamino antimicrobial agents

Different polyamino antimicrobial agents have been designed and we can classify these derivatives according two major classes belonging to a steroidal or a non-steroidal family.



**Figure 1. Structure of derivative SQ109 18.**

Table 4. Structure and antimicrobial activities of zeamine 19.

						
Zeamine 19						
Strain	<i>S. aureus</i> ATCC25531	<i>B. Cereus</i> XJ8	<i>E. coli</i> CFT073	<i>B. Cepacia</i> H111	<i>P. Aeruginosa</i> PAO1	<i>K. pneumoniae</i>
19	0.3	3	3	50	5	6

All values are minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ).  
Data taken with permission from [21].

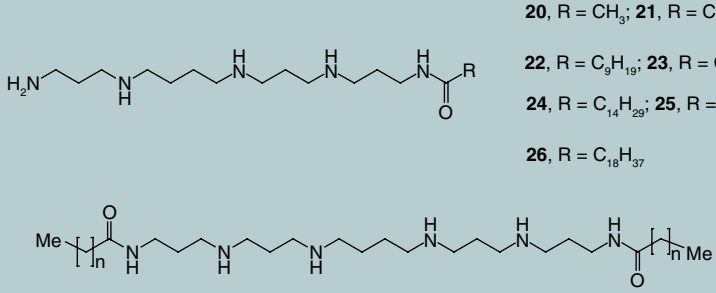
### Nonsteroidal derivatives

In 1998, Cook *et al.* have prepared a 1638-member meta-substituted benzyl pyridinopolyamine library by solution-phase chemistry. Twelve compounds **1–12** exhibit potent, highly selective activity against Gram-positive bacteria over Gram-negative bacteria and very high specificity for bacteria compared with the fungus *Candida albicans*. Thus, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* and *Enterococcus faecalis* were inhibited at MICs of 1–12  $\mu\text{M}$ , whereas MICs for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* and *P. aeruginosa* were  $>100 \mu\text{M}$ . It clearly appeared that functional groups in the meta-positions of the benzyl functionality set do indeed provide sufficient differentiating diversity to allow biological activities to be separated and identi-

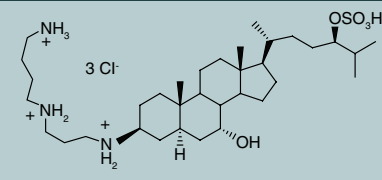
fied from a library by iterative and positional scanning deconvolution processes (Table 2) [17].

On the other hand, a series of chloramphenicol (CAM) amides with polyamines **13–17** were recently synthesized either by direct attachment of the PA chain on the 2-aminopropane-1,3-diol backbone of CAM, previously oxidized selectively at its primary hydroxyl group, or from chloramphenicol base (CLB) through acylation with succinic or phthalic anhydride and finally coupling with a PA. In this context, conjugates **16** and **17** possessing a dibenzylated spermidine moiety through the succinate linker were the most potent antibacterial agents against Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacterial strains (Table 3) [18].

Table 5. Structure and antimicrobial activities of mono- and bis-acyl polyamines 20–32.

					
		20, R = CH <sub>3</sub> ; 21, R = C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>			
		22, R = C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> ; 23, R = C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>			
		24, R = C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> ; 25, R = C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>			
		26, R = C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>			
		27, n = 7; 28, n = 8; 29, n = 10;			
		30, n = 13; 31, n = 15; 32, n = 17			
Compound	<i>S. aureus</i> (WT)	<i>E. coli</i> (A2058G)	Compound	<i>S. aureus</i> (WT)	<i>E. coli</i> (A2058G)
20	250	62.5	27	15.6	31.25
21	125	62.5	28	3.9	31.25
22	62.5	62.5	29	15.6	31.25
23	15.6	31.25	30	250	62.5
24	15.6	31.25	31	250	62.5
25	15.6	62.5	32	125	62.5
26	15.6	62.5			

All values are minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{M}$ ).  
WT: Wild-type.  
Data taken with permission from [22].

**Table 6. Antibacterial activities of squalamine 33.**


Squalamine 33

Compound	Gram-positive bacteria				Gram-negative bacteria		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>
<b>33</b>	2–8	32	–	8	2–8	8	32

Values are minimum inhibitory concentrations (mg/l).  
Data taken with permission from [23].

Among infectious diseases, tuberculosis still remains one of the leading single agent killer in the world with around 2 million of deaths each year. Polyamino derivatives N-geranyl-N'-(2-adamantyl) ethane-1,2-diamine SQ109 **18** (Figure 1), a second-generation agent from the first-line drug ethambutol demonstrated interesting activities against both *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* with MICs of 0.5 and 2 µg/ml, respectively [19].

Nevertheless, the bioavailability of this product remains low limiting its development and therapeutical use [20].

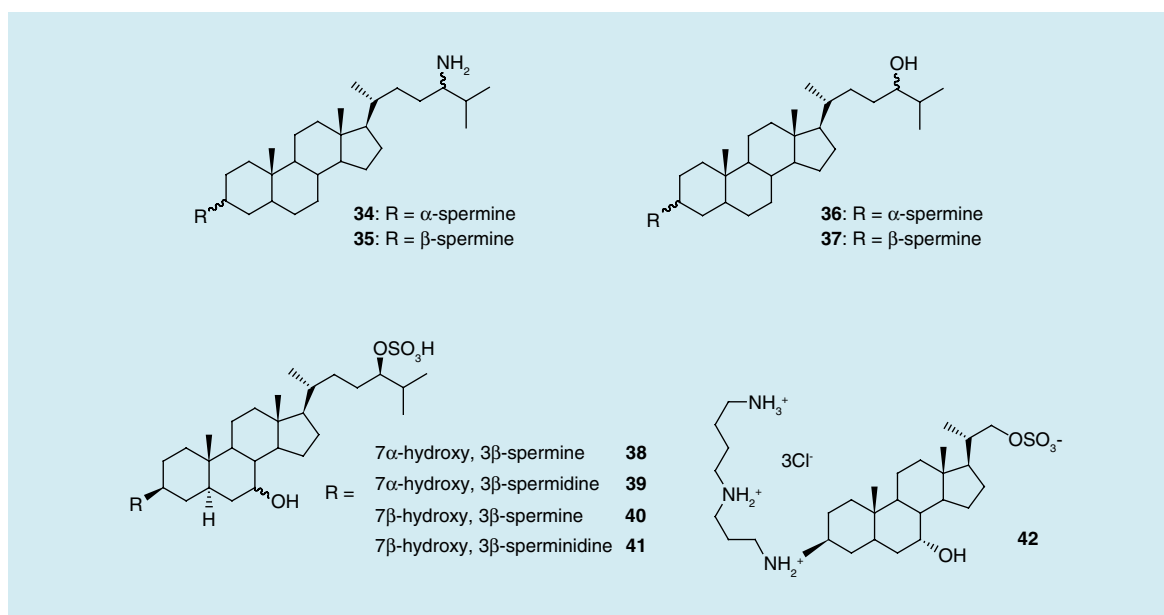
In 2010, Wu *et al.* isolated from the bacterial pathogen *Dickeya Zeae* strain DZ1 a new antibacterial compound namely zeamine **19**. Of peculiar note is that numerous MDR bacteria such as *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* are susceptible to zeamine with excellent to moderate MIC values varying from 0.3 to 50 µg/ml depending on the nature of the considered bacterial strain (Table 4) [21].

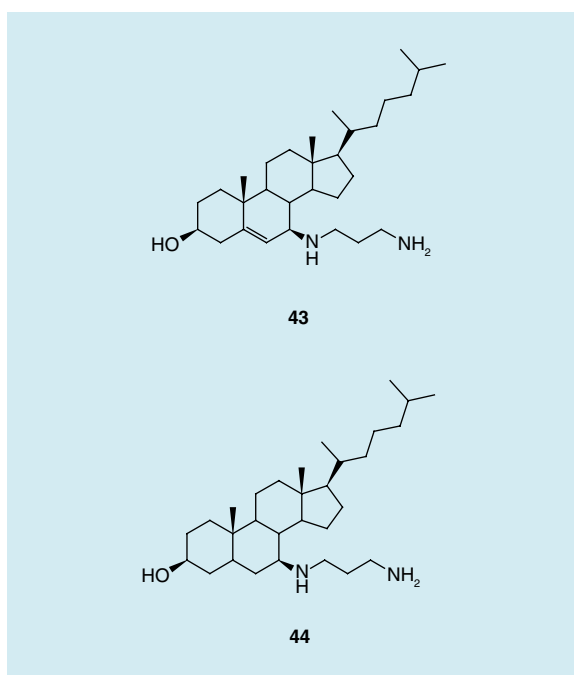
Finally, homologous series of mono- and bis-acyl polyamines **20–32** with varying acyl chain lengths were also designed and presented moderate MICs against Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli*) bacterial strains (Table 5) [22].

### Steroidal derivatives

On the other hand, numerous compounds possessing a sterol core were identified to possess interesting antibacterial activities. Among them, Squalamine **33**, a natural polyaminosterol derivative isolated from the shark *Squalus acanthias* was reported to be active against a large panel of microorganisms with MICs ranging from 1 to 8 µg/ml against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table 6) [23].

On the basis of such results, the synthesis of numerous derivatives **34–37** from stigmasterol was achieved by Shu *et al.* (Figure 2) demonstrating that 3β analogs exhibit better activity than 3α ones [24]. From his part,

**Figure 2. Structures of polyaminosterol derivatives 34–42.**



**Figure 3. Structure of 7-polyaminosterol derivatives 43–44.**

Selinsky *et al.* reported that squalamine analogs **38–41** differing in the identity of the polyamine attached at C3 of the sterol, and the stereochemistry of a hydroxyl substituent at C7 possessed different antimicrobial activities [25]. Thus, analogs with a tetraammonium spermine polyamine appear to be somewhat more active than analogs with a shorter trisammonium spermidine polyamine, and analogs with an axial ( $\alpha$ ) hydroxyl substituent at C7 are more active than analogs with the corresponding equatorial ( $\beta$ ) hydroxyl one. Otherwise, 7 $\beta$ -OH spermine analog is the most active compound against *E. coli*, but the least effective against *P. aeruginosa* (MICs varying from 1 to 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively).

On the other hand, Khan *et al.* reported the synthesis of a series of 3 $\beta$ -hydroxy-7 $\alpha$ -amino 23,24-bisnor-5 $\alpha$ -cholan-22-ol derivatives such as compound **42** which demonstrates a good activity against Gram-

positive bacteria (MIC values 1.6–25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) with respect to Gram negative ones (MIC value 6.3 to >100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) [26,27]. Similar results were encountered by Kim *et al.* by using 3-polyamino-23,24-bisnor-cholane derivatives [28].

Amino deoxycholic acid derivatives were also reported to be active against numerous bacteria and even against vancomycin- and methicillin-resistant strains suggesting a high correlation between the cationic charge of the polyamine chain group and the biological activity [29]. Recently, numerous 3 and 7-polyaminosterol squalamine analogs such as **43–44** (Figure 3) were synthesized and demonstrated good activities against both Gram-positive and Gram-negative bacterial strains with MICs varying from 2.5 to 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [30,31] even against MDR strains recovered from cystic fibrosis patients (137 strains) [32].

In the case of Gram-positive bacteria, Alhanout *et al.* demonstrated that the activity of squalamine or its parent derivatives is due to a strong depolarization of the membrane with drained cytoplasmic content suggesting a ‘detergent-like’ mechanism [33]. On the opposite, in the case of Gram-negative bacteria these derivatives are able to disturb the membrane integrity of Gram-negative bacteria by interaction with negative charges of phosphate groups of the lipopolysaccharide (LPS) at the surface of the outer membrane [34].

On the basis of such a mechanism, 3,20-Amino- and polyaminosteroid analogs of squalamine such as derivative **45** were synthesized and evaluated for their *in vitro* antimicrobial properties against reference and clinical bacterial strains exhibiting MICs ranging from 2.5 to 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Table 7) [35].

Antiseptics and disinfectants are widely used in hospitals for materials disinfection in order to avoid nosocomial infections [36]. Thus, medical devices with long residence times such as catheter were susceptible to bacterial biofilm colonization and may be a source of infection. In this context, soluble squalamine tablets have been developed for the rapid disin-

**Table 7. Antibacterial activities of the 3,20-polyaminosterol derivative 45.**

Compound	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>I. limosus</i>	<i>B. cepacia</i>
<b>45</b>	2.5	5	2.5	10–20	>40

All values are minimum inhibitory concentrations (ml).  
Data taken with permission from [35].

Table 8. Chemical structure of naphthylacetylspermine 46 and methoctramine 47 and their use as chemosensitizers against *Escherichia coli*.

Antibiotic	Used concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) of polyamines 46 and 47												
	None	Naphthylacetylspermine 46								Méthoctramine 47			
None	1	2	4	8	16	32	64	128	1	2	4	8	
Novobiocine	128	128	64	32	16	8	4	1	0.5	128	128	32	16
Erythromycine	64	64	64	64	31	16	8	4	4	64	64	32	16

All values are minimum inhibitory concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ).  
Data taken with permission from [37].

fection of home nebulizers of cystic fibrosis patients. Thus, 0.5 g/l squalamine reduced the levels of viable *S. aureus* and *P. aeruginosa* by 5 log<sub>10</sub> and the level of viable *C. albicans* by 4 log<sub>10</sub> after 20 min.

### Development of polyamino chemosensitizers for antibiotic activity enhancement

One of the first studies was realized by Yasuda *et al.* in 2004 dealing with the synthesis and use of naphthylacetylspermine 46 and methoctramine 47 as chemosensitizer agents increasing *E. coli* membrane permeability. No intrinsic antimicrobial properties were encountered for these compounds but they are able to highly potentiate novobiocine or erythromycin antimicrobial activities (Table 8). It has been suggested that these compounds could alter membrane integrity by displacing divalent cations leading to

an enhancement of novobiocine and erythromycin entrance [37].

Otherwise, due to its previously described properties, an approach using squalamine as a chemosensitizer agent has been envisioned against resistant strains by using it at 1/5 and 1/10 of its MIC value to enhance significantly the activity of numerous antibiotics against isogenic multidrug *E. coli* AG100 and AG100Atet strains (Table 9) [38].

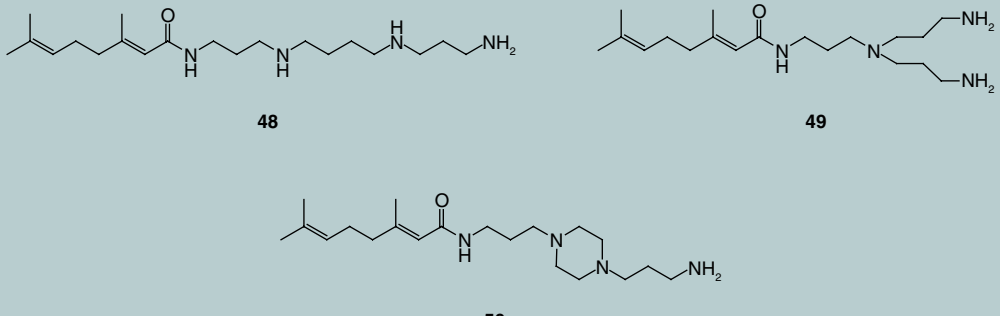
Such a result appears to be of great interest for the development of new drug combinations against MDR bacteria. Due to all of these considerations, LPS assembly became recently an interesting target due to the fact that its disruption could enhance the entrance of antibiotics through Gram-negative outer membranes. Thus, geraniol, a natural monoterpene encountered in many plant extracts, was demon-

Table 9. Effect of subinhibitory concentrations of squalamine 33 on the antibiotic susceptibility of various Gram-negative bacteria.

Strains	Addition	CHL	CIP	TET	FEP	ERY
<b>MIC (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>						
<i>E. coli</i> AG100	0	8	0.25	2	0.5	512
	+1/5 Sq	0.5	0.03	0.125	0.06	256
	+1/10 Sq	1	0.015	0.25	0.12	256
<i>E. coli</i> AG100A ( <i>acrAB</i> -)	0	2	0.06	2	0.5	128
	+1/5 Sq	1	0.06	0.12	0.12	64
	+1/10 Sq	2	0.03	0.12	0.12	64
<i>E. coli</i> AG100tet ( <i>acrAB</i> -, over-producing other pumps)	0	16	1	64	1	256
	+1/5 Sq	2	0.03	8	0.12	256
	+1/10 Sq	4	0.03	16	0.25	128

Sq 33 was used at 1/10 and 1/5 of its MIC determined for each strain.  
CHL: Chloramphenicol; CIP: Ciprofloxacin; ERY: Erythromycin; FEP: Cefepime; MIC: Minimum inhibition concentration; Sq: Squalamine; TET: Tetracycline.  
Data taken with permission from [38].

Table 10. Decrease of chloramphenicol and nalidixic acid resistance in the presence of compounds 48–50.



Cpd	<i>Enterobacter</i>			<i>Salmonella</i>		
	Concentration (μM)	MIC ratio		Concentration (μM)	MIC ratio	
		CHL <sup>†</sup>	NAL <sup>†</sup>		CHL <sup>†</sup>	NAL <sup>†</sup>
PABN	38	16	8	38	8	64
<b>48</b>	31	16	4	31	8	32
<b>49</b>	62.5	8	8–16	125	16	64
<b>50</b>	250	8	4	250	8	64

<sup>†</sup>MICratio is determined as the MIC of the antibiotic alone for each strain (i.e., chloramphenicol or nalidixic acid) to the MIC of the same antibiotic in the presence of compounds 48–50. A ratio up to 1 indicates an improvement of the activity of the antibiotic in the presence of the considered compound.  
MIC: Minimum inhibition concentration.

strated to act in a synergistic manner with several antibiotics against Gram-negative bacterial species. Numerous geraniol derivatives including geranylamine and polyaminogeranic acid molecules **48–50** were prepared and successfully investigated as chemosensitizers of chloramphenicol and nalidixic acid against *Enterobacter* and *Salmonella* strains (Table 10). It has been also demonstrated that they can alter the activity of a drug transporter and inhibit the major Enterobacteriaceae efflux pump, AcrAB-TolC [39].

In this context, another original chemical strategy was developed to prepare non cytotoxic ianthelliformisamine derivatives **51–56** which dramatically affected the antibiotic susceptibility of *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* MDR strains (Table 11) [40].

This efficiency was correlated with the inhibition of

a dye transport, suggesting an action of these molecules on the activity of drug transporters. Due to their low cytotoxicity these kind of molecules could open the way for the development of new therapeutical strategies.

### Conclusion

It clearly appears that even if polyamines are essential for life and are widely involved for growth cells their particular structure confers them the possibility to lead to the emergence of a new class of antimicrobial agents against MDR pathogens and to become a potent last-line therapeutic drug in the future.

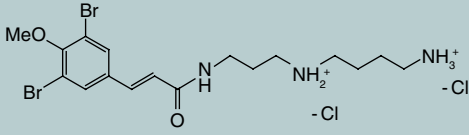
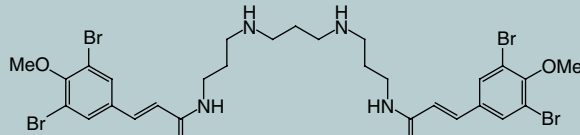
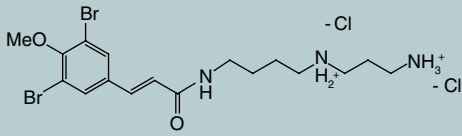
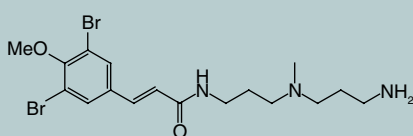
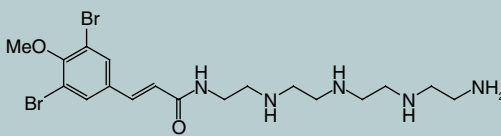
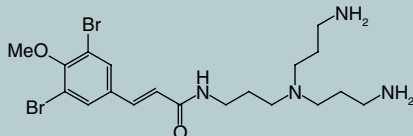
### Future perspective

During the last decades, the search and commercial development of new antibiotics did not follow the

#### Executive summary

- Each year in the USA, 2 million people become infected with bacteria and at least 23,000 people die annually as a direct result of these infections. Thus, the rise of antibiotic resistance since few decades has resulted in a very pressing need for the discovery of novel antibiotics or treatment strategies.
- Efficacious small-molecule enhancers designed to efficiently target bacterial membranes could serve as lead compounds in the repositioning process of old neglected antibiotics.
- Search for polyamine derivatives acting by membrane depolarization and/or integrity membrane disruption could constitute an efficient alternative since their mechanism of action may significantly reduce the development of resistance.
- Enlarge the specificity of polyamine derivatives toward bacteria in order to minimize adverse effects expected when used to fight infections.

**Table 11. Concentration of lanthelliformisamine derivatives 51–56 necessary to restore doxycycline activity (2 µg/ml) against Ea289, PAO1 and KPC2 ST258 Gram-negative bacterial strains.**

			
<b>lanthelliformisamine B</b> <b>51</b>	<b>lanthelliformisamine C</b> <b>52</b>		
			
<b>Tokaridine C</b> <b>53</b>	<b>54</b>		
			
<b>55</b>	<b>56</b>		
<b>Compound</b>	<b>Concentration of lanthelliformisamine derivative used (µM)</b>		
	<b>Ea289</b>	<b>PAO1</b>	<b>KPC2 ST258</b>
<b>51</b>	25	12.5	3.12
<b>52</b>	12.5	3.12	12.5
<b>53</b>	6.25	3.12	3.12
<b>54</b>	12.5	6.25	3.12
<b>55</b>	12.5	6.25	3.12
<b>56</b>	6.25	3.12	3.12
Ea289: <i>Enterobacter aerogenes</i> 289; KPC2ST258: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST2558; PAO1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Data taken with permission from [40].			

rhythm of emergence of MDR bacteria. An alternative to this strategy is the finding of active molecules (that we will call antibiotic potentiators or chemosensitizers), preferably with a weak antibiotic activity and that in combination with antibiotics are able to enhance or synergize the antimicrobial activity of the latter. Antibiotic adjuvants can function either by reversing resistance mechanisms in naturally sensitive pathogens or by sensitizing intrinsic resistant strains. Thus, the use of antibiotic adjuvants has two beneficial outcomes: enhancement of the antimicrobial effect and reduction of the occurrence of mutations that results in resistance. In this context and as underlined in this review the search for molecules such as polyamine derivatives which act by membrane depolarization and/or integrity membrane disruption could constitute an efficient alternative since their mechanism of action may significantly

reduce the development of resistance. Finally, we can envision that the continuous advances in the development of new and potent high-throughput technologies will definitely allow the discovery of new compounds with antibiotic adjuvant activity which is a less expensive alternative to the problem of multidrug resistance.

#### Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.



## References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 O'connell KMG, Hodgkinson JT, Sore HF *et al.* Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 10706–10733 (2013).
- 2 Som A, Navasa N, Percher A *et al.* Identification of synthetic host defense peptide mimics that exert dual antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(11), 1784–1791 (2012).
- 3 De bandt JP, Moinard C, Cynober L. Métabolisme et fonctions des polyamines. *Immunoanal. Biol. Spécial.* 21, 333–341 (2006).
- **Provides detailed information about polyamines metabolism.**
- 4 Seiler N. Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect. and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr. Drug Targets* 4, 537–564 (2003).
- 5 Hill IR, Garnett MC, Bignotti F, Davis SS. *In vitro* cytotoxicity of poly(amidoamine)s, relevance to DNA delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 161–174 (1999).
- 6 Sparapani M, Dall'Olio R, Gandolfi O *et al.* Neurotoxicity of polyamines and pharmacological neuroprotection in cultures of rat cerebellar granule cells. *Exp. Neurol.* 148, 157–166 (1997).
- **Provides detailed information about polyamines toxicity.**
- 7 Ralton L, Bestwick CS, Lin PKT. Polyamine analogues and derivatives as potential anticancer agents. *Curr. Bioact. Compd.* 3, 179–191 (2007).
- 8 Dela Vega AL, Delcour AH. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 178(13), 3715–3721 (1996).
- 9 Kwon DH, Lu CD. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(5), 1615–1622 (2006).
- 10 Leeuwenhoek DA. De natise semine genitali animalculis. *Philos. Trans. Roy. Soc.* 2, 1040–1043 (1677).
- 11 Samartzidou H, Delcour AH. Excretion of endogenous cadaverine leads to decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 181(3), 791–798 (1999).
- 12 Chaturvedi R, Asim M, Barry DP *et al.* Spermine oxidase is a regulator of macrophage host response to *Helicobacter pylori*: enhancement of antimicrobial nitric oxide generation by depletion of spermine. *Amino Acids* 46(3), 531–542 (2014).
- 13 Johnson L, Mulcahy H, Kanevets U *et al.* Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 194(4), 813–826 (2012).
- 14 Goytia M, Shafer WM. Polyamines can increase resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to mediators of the innate human host defense. *Infect. Immun.* 78(7), 3187–3195 (2010).
- 15 Kwon DH, Lu CD. Polyamines increases antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(5), 1623–1627 (2006).
- **Provides detailed information about polyamines as antibiotic enhancer.**
- 16 Vaara M, Vaara T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24(1), 107–113 (1983).
- 17 An H, Haly BD, Cook PD. Discovery of novel pyridinopolyamines with potent antimicrobial activity: deconvolution of mixtures synthesized by solution-phase combinatorial chemistry. *J. Med. Chem.* 41(5), 706–716 (1998).
- 18 Magoulas GE, Kostopoulou ON, Garnelis T *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol-polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* 23(13), 3163–3174 (2015).
- 19 Reddy VM, Einck L, Andries K *et al.* *In vitro* interactions between new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(7), 2840–2846 (2010).
- 20 Meng Q, Luo H, Liu Y *et al.* Synthesis and evaluation of carbamate prodrugs of SQ109 as antituberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 2808–2810 (2009).
- 21 Wu J, Zhang HB, Xu JL *et al.* <sup>13</sup>C Labeling reveals multiple amination reactions in the biosynthesis of a novel polyketide polyamine antibiotic zeamine from *Dickeya zea*. *Chem. Commun.* 46, 333–335 (2010).
- 22 Balakrisna R, Wood SJ, Nguyen TB *et al.* Structural correlates of antibacterial and membrane-permeabilizing activities in acylpolyamines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(3), 852–861 (2006).
- 23 Moore KS, Wehrli S, Roder H *et al.* Squalamine, an aminosterol antibiotic from the shark. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 1354–1358 (1993).
- **Provides detailed information about squalamine.**
- 24 Shu Y, Jones SR, Kinney WA *et al.* The synthesis of spermine analogs of the shark aminosterol squalamine. *Steroids* 67, 291–304 (2002).
- 25 Tessema TD, Gassler F, Shu Y *et al.* Structure-activity relationships in aminosterol antibiotics: The effect of stereochemistry at the 7-OH group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3377–3381 (2013).
- 26 Khan SN, Jung YM, Kim BJ *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of 7 alpha-amino-23, 24-bisnor-5 alpha-cholan-22-ol derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2558–2561 (2008).
- 27 Khan SN, Kim HS. Synthesis and biological activities of 3-polyamino-5-beta cholane-7 alpha, 24 diols. *J. Indus. Eng. Chem.* 15, 561–565 (2009).
- 28 Kim HS, Khan SN, Jadhav JR *et al.* A concise synthesis and antimicrobial activities of 3-polyamino-23,24-bisnorcholanes as steroid-polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 3861–3865 (2011).
- 29 Kikuchi K, Bernard EM, Sadownik A *et al.* Antimicrobial activities of squalamine mimics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1433–1438 (1997).



- 30 Loncle C, Salmi C, Letourneux Y *et al.* Synthesis of new 7-aminosterol squalamine analogues with high antimicrobial activities through a stereoselective titanium reductive amination reaction. *Tetrahedron* 63, 12968–12974 (2007).
- 31 Salmi C, Loncle C, Vidal N *et al.* New stereoselective titanium reductive amination synthesis of 3-amino and polyaminosterol derivatives possessing antimicrobial activities. *Eur. J. Med. Chem.* 43, 540–547 (2008).
- 32 Alhanout K, Brunel JM, Raoult D *et al.* *In vitro* antibacterial activity of aminosterols against multidrug-resistant bacteria from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 810–814 (2009).
- 33 Alhanout K, Malesinki S, Vidal N *et al.* New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. *J. Antimicrob. Chemother.* 17, 3909–3917 (2010).
- 34 Salmi C, Loncle C, Vidal N *et al.* Squalamine, an appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant gram-negative bacteria? *PLoS ONE* 3, e2765 (2008).
- 35 Djouhri L, Vidal N, Rolain JM *et al.* Synthesis of new 3,20-bispolyaminosteroid squalamine analogues and evaluation of their antimicrobial activities. *J. Med. Chem.* 54, 7417–7421 (2011).
- 36 Djouhri L, Alhanout K, Andrieu V *et al.* Soluble squalamine tablets for the rapid disinfection of home nebulizers of cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 11, 555–559 (2012).
- 37 Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T. Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 67–75 (2004).
- 38 Lavigne JP, Brunel JM, Chevalier J *et al.* Squalamine, an original chemosensitizer to combat antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 799–801 (2010).
- **Provides detailed information about squalamine as antibiotic enhancer.**
- 39 Brunel JM, Lieutaud A, Lome V *et al.* Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1174–1179 (2013).
- 40 Pieri C, Borselli D, Di Giorgio C *et al.* New ianthelliformisamine derivatives as antibiotic enhancers against resistant Gram-negative bacteria. *J. Med. Chem.* 57, 4263–4272 (2014).
- **Provides detailed information about new natural polyamino derivatives as highly efficient antibiotic enhancer.**

## Chapitre III.

### Discussion Générale et perspectives

Ce travail de thèse s'est effectué au sein d'un dispositif CIFRE, dans le cadre d'une collaboration entre l'UMR-MD1 et l'industriel pharmaceutique vétérinaire Virbac. Par le passé, les résultats obtenus en utilisant le *principe de thérapie combinatoire* pour traiter la colibacillose aviaire impliquant le pathogène *E. coli* ont encouragé la poursuite de recherches dans cette voie.

L'objectif du travail de thèse était de trouver une solution permettant de *diminuer la consommation d'ATBs dans les élevages porcins* touchés par des infections respiratoires. Le principe fut de combiner des nouvelles molécules à visée thérapeutique avec des ATBs communs dans le but de potentialiser leur activité. Nous nous sommes particulièrement intéressés au potentiel thérapeutique des *molécules polyaminées* car elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques chez les bactéries et possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes, notamment vis-à-vis de la résistance bactérienne. Dans ce contexte nous avons également adressé la *problématique de l'antibiorésistance en médecine humaine* en testant différentes *combinaisons ATB / dérivés polyaminés* sur les pathogènes les plus problématiques en clinique, les pathogènes « ESKAPE ». Ce projet s'est ainsi déroulé à l'interface chimie – biologie.

Différentes séries chimiques ont été synthétisées et leur activité a été évaluée en microbiologie par différentes méthodes permettant de mesurer à la fois leur activité antibactérienne intrinsèque et leur capacité à potentialiser les ATBs à des doses sub-inhibitrices. Pour les molécules présentant le meilleur profil d'activité adjuvante nous avons également étudié leur mode d'action afin de mieux comprendre les relations entre les différents groupements pharmacophoriques et l'activité biologique.

L'étude conduite avec la série des *ianthelliformisamines* a permis de mettre en évidence que les dérivés naturels et synthétiques étaient capables de *potentialiser l'activité de différentes familles d'ATBs* avec une meilleure sélectivité pour le céfépime et la doxycycline, sur différentes espèces bactériennes présentant une relevance clinique importante en médecine humaine telles que *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. L'absence de potentialisation du chloramphénicol qui est un substrat des pompes d'efflux pourrait s'expliquer par la présence d'une chloramphénicol

acétyltransférase dans les souches testées (388). Ces composés exercent leur activité adjuvante en provoquant une **dépolarisation de la membrane interne** qui n'est pas corrélée avec une perméabilisation de l'enveloppe bactérienne. Les pompes d'efflux étant largement impliquées dans la résistance naturelle et acquise des BGN, il est fort probable que l'altération de la FPM provoque une **inhibition des systèmes d'efflux**. Afin de confirmer cette hypothèse il serait intéressant de conduire des études d'efflux en temps réel par des méthodes de fluorescence permettant de mettre en évidence des inhibiteurs du transport actif d'une molécule substrat de l'efflux, le 1,2'-DNA. Il pourrait également être pertinent de comparer l'effet des molécules à celui du CCCP, qui par son action découplante de la FPM permet de dé-energiser les pompes d'efflux et de charger les membranes bactériennes avec le 1,2'-DNA. Des études de cytotoxicité sont également à envisager afin d'évaluer leur activité sur les cellules eucaryotes.

L'étude effectuée avec les **dérivés polyamino-isopréniques** nous a permis de mettre au point des **conditions de criblage** permettant d'identifier uniquement des molécules adjuvantes à un ATB donné au sein d'une chimiothèque, en écartant celles qui pourraient avoir un effet intrinsèque. Ainsi, nous avons pu identifier un **adjuvant** à la doxycycline chez *P. aeruginosa*. Cette étude est la **preuve de concept** qu'en adressant la **résistance naturelle des BGN**, l'on peut améliorer l'arsenal thérapeutique avec les ATBs disponibles sur le marché. En effet nous avons montré que la combinaison d'un composé polyamino-isoprénique avec la doxycycline permettait de diminuer la CMI de la souche en deçà du seuil de sensibilité et cela même chez un pathogène présentant une haute résistance intrinsèque comme *P. aeruginosa*. De plus, les concentrations en dérivés polyamino-isopréniques nécessaires pour restaurer la sensibilité à la doxycycline sont nettement inférieures à celles utilisées avec le **PAβN**, qui est l'inhibiteur d'efflux de référence chez *P. aeruginosa* ce qui démontre la forte synergie entre l'ATB et le dérivé. Les résultats obtenus sur les isolats cliniques démontrent que l'efficacité des dérivés, et particulièrement du composé **3** est indépendante de tout mécanisme de résistance acquis. En effet, nous avons pu montrer que le composé **3** agit sur la membrane et certaines de ses fonctions. Il provoque dans une certaine mesure une **perméabilisation de la membrane** et le **blocage des pompes d'efflux** notamment par une **dépolarisation membranaire**. Par ailleurs, les résultats de la cytotoxicité des composés encouragent le développement de ce type de molécules, d'autant que les

quantités utilisées sont faibles. Dans ce contexte, il apparaîtrait très intéressant de tester le potentiel adjuvant de ce composé sur des isolats cliniques issus de patients atteints de la *mucoviscidose*. En effet, ces patients souffrent d'*infections respiratoires persistantes* dont *P. aeruginosa* est un des agents pathogènes le plus problématique, notamment car les bactéries s'organisent en superstructures très imperméables aux ATBs, appelées *biofilms*. Tout d'abord, il serait pertinent de tester l'effet du composé à la fois sur la formation des biofilms mais également sur la capacité à détruire un biofilm mature. Cela permettrait d'apporter de nouvelles perspectives de traitement à ces patients dont l'arsenal thérapeutique qui leur est proposé diminue drastiquement avec le temps. Chez ces patients, les *infections respiratoires* sont *persistantes* et nécessitent souvent de longs traitements ATBs qui ne sont d'ailleurs pas toujours efficaces. En effet, les bactéries contenues dans les biofilms étant exposées à diverses molécules acquièrent des résistances avec l'exposition aux antibactériens ce qui complique d'autant plus les possibilités de traitement. On peut d'ailleurs retrouver au sein d'une même population des *sous-populations* présentant des profils de sensibilité aux ATBs différents (389). Pour faire face à ces infections des stratégies alternatives sont donc nécessaires. Il a été admis que pour traiter des infections quiescentes comme celles qui touchent les patients atteints de mucoviscidose, *altérer les fonctions membranaires* par une action directe de déstabilisation ou indirecte en inhibant le métabolisme énergétique par un effet délétère sur certaines composantes membranaires telle que la FPM, pourrait constituer une *approche thérapeutique prometteuse* (389). En effet, il a été montré que des molécules possédant des propriétés membranotropes comme la daptomycine sont également actives contre les biofilms de streptocoque et de staphylocoque (390). Par ailleurs, dans le cas d'infections persistantes, les bactéries développent différentes stratégies de production d'énergie afin de survivre dans l'hôte dans des conditions de carences de nutriments et d'oxygène. La respiration anaérobie par exemple, est générée par la FPM qui assure une production d'ATP basse, mais suffisante pour assurer la survie de la bactérie dans l'hôte. C'est ainsi grâce à la fermentation et / ou la respiration anaérobie que les microorganismes retrouvés au sein des biofilms tels que *P. aeruginosa* (391), (392) ou encore les agents dormants comme par exemple *Mycobacterium tuberculosis* (393) assurent leur survie. Cibler le *métabolisme énergétique* constitue donc une *stratégie de lutte contre les infections* innovante et intéressante (393). Dans ce contexte, la combinaison d'ATBs avec des dérivés polyamino-isopréniques pourrait constituer

une stratégie intéressante notamment pour lutter contre les biofilms impliquant des BGN. Par ailleurs, les résultats obtenus par les tests de cytotoxicité sur les différentes lignées cellulaires testées (CHO et fibroblastes), encouragent le développement de ce type d'adjuvant malgré l'effet membranotrope observé qui jusqu'alors était incompatible avec le développement.

L'étude menée avec la série chimique des *motuporamines* a permis d'identifier de nouveaux composés capables de potentialiser l'activité d'ATBs. Initialement, ces molécules ont été développées à des fins anti-cancéreuses mais nous avons pu montrer que leur *potentiel thérapeutique est pluripotent*, à l'instar des dérivés de ianthelliformisamines. Ces molécules, par leur *caractère amphiphile* ont montré une capacité à perméabiliser les membranes des BGN ce qui provoque une dépolarisation membranaire importante. Une des conséquences de cette dépolarisation est l'inhibition des systèmes d'efflux à l'origine de l'activité adjuvante des molécules. Comme pour les dérivés ianthelliformisamines, l'étude de la cytotoxicité de ces composés reste à évaluer afin de pouvoir envisager le développement de cette série chimique comme agent thérapeutique, dans une démarche de « hit to lead ».

Enfin l'étude effectuée sur *B. bronchiseptica* a permis de transposer le modèle de *thérapie combinatoire* développé dans les études précédentes en utilisant particulièrement les *dérivés polyamino-isopréniques* et de l'appliquer à la *médecine vétérinaire*. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, l'utilisation massive des ATBs dans les élevages représente un enjeu sanitaire majeur et contribue largement à l'expansion du phénomène d'antibiorésistance et à la survenue d'échecs thérapeutiques. Afin de faire face à ce fléau, une réponse multifactorielle est indispensable. Cependant, le *contrôle et la maîtrise de la consommation* d'ATBs reste un facteur clef (394). Nous avons pu montrer qu'en associant une molécule à un ATB couramment utilisé en thérapie curative nous pouvions en augmenter l'efficacité, et par conséquent *diminuer les quantités* nécessaires pour inhiber la croissance bactérienne. A notre connaissance, à ce jour, aucune étude n'a été conduite dans ce sens en médecine vétérinaire. Nous avons montré que les dérivés polyamino-isopréniques pourraient également être utilisés comme *inhibiteur de la virulence bactérienne*. En effet, outre leurs propriétés adjuvantes lorsqu'ils sont utilisés en combinaison, ces composés utilisés seuls, sont

capables d'inhiber la *mobilité bactérienne flagelle-dépendante* et cela indépendant du profil de résistance aux ATBs de la souche. Ce mode d'action mixte représente un avantage à différents niveaux. L'effet délétère pour la bactérie est double, la molécule agit à la fois sur la résistance bactérienne et sur sa virulence ce qui pourrait impacter de manière significative l'établissement de l'infection. Certains paramètres restent néanmoins à évaluer, telle que l'étude pharmacologique des dérivés polyaminoisopréniques qui est absolument indispensable afin d'étudier le comportement de la combinaison avec le florfénicol chez les porcs. Il serait intéressant de poursuivre l'étude en testant la combinaison sur d'autres pathogènes également responsables d'infections respiratoires chez le porc tels que *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* ou encore *H. parasuis* avec d'autres ATBs comme la tylosine.

Comme nous avons pu le voir, la membrane bactérienne assure le maintien de nombreuses fonctions cellulaires. Elle assure une perméabilité sélective et maintient une homéostasie cellulaire ainsi que la transduction du métabolisme énergétique. De plus, elle est le site de transport actif des nutriments et des déchets cellulaires, elle est également le siège de la respiration et de l'établissement du gradient de protons à l'origine de la FPM et de la synthèse d'ATP, et enfin, de la communication intercellulaire dans les biofilms. Les ATBs ayant pour cible la membrane ou encore les résultats des nombreuses recherches sur les peptides antimicrobiens confirment que la *membrane bactérienne* est une *cible de choix* dans le développement de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Cependant, en pratique peu d'efforts sont investis dans la recherche et développement de molécules ayant pour cible la membrane, notamment par crainte que ces interactions soient non-spécifiques des membranes bactériennes et altèrent aussi l'intégrité des cellules eucaryotes (253). Pourtant, il est reconnu que la capacité des bactéries à développer des résistances vis-à-vis d'agents ayant pour cible la membrane ou ses fonctions est limitée (389). A travers les différentes études que nous avons présentées nous avons pu mettre en évidence que les *polyamines*, en tant qu'*agents ayant pour cible la membrane bactérienne* et ses fonctions, telle que la FPM, pourraient constituer un *nouvel outil thérapeutique* pour lutter contre les infections bactériennes et restaurer l'activité de nombreux ATBs.

Par ailleurs, quelle que soit la série chimique considérée, conduire l'*étude pharmacologique* est essentielle. Cela consiste à étudier la relation entre la *pharmacocinétique* et la *pharmacodynamique* qui sont des paramètres importants qui peuvent conditionner le fait qu'une molécule soit utilisable ou non en thérapeutique et qui permettent également de déterminer la voie d'administration. En effet, il est indispensable d'étudier le *comportement d'une substance active dans l'organisme* après son administration, ce dernier peut se décomposer en 4 étapes majeures d'où l'acronyme international pour désigner ce processus (ADME) : l'*absorption*, la *distribution*, le *métabolisme* et l'*excrétion* du principe actif et de ses métabolites. Dans le cadre d'une thérapie combinatoire il est absolument nécessaire que les molécules présentent un profil pharmacocinétique similaire afin qu'elles puissent agir sur la cible en même temps et de manière efficace. Aussi, lors de la collaboration initiale entre Virbac et l'UMR-MD1 le projet a été avorté car la pharmacocinétique du dérivé polyaminé sélectionné dans le plasma de poulet ne permettait pas une absorption au niveau de la barrière intestinale suffisante pour pouvoir envisager un traitement combinatoire avec la doxycycline qui est l'ATB de premier choix dans le traitement de la colibacillose aviaire. De la même façon il est indispensable de déterminer la pharmacodynamique *in vivo* afin de confirmer l'effet thérapeutique dans l'organisme mais également d'identifier les éventuels *effets indésirables*. Cela permettra d'identifier la *fenêtre thérapeutique* c'est-à-dire la zone dans laquelle les concentrations sont à la fois actives pour traiter l'individu (homme ou animal) et où les effets indésirables sont limités. Cet intervalle thérapeutique est défini en fonction du *seuil thérapeutique*, c'est-à-dire la concentration minimale en deçà de laquelle aucune activité n'est observée et de la *limite supérieure* qui est la concentration maximale au-delà de laquelle apparaissent des effets indésirables. Une fois les paramètres pharmacologiques déterminés, les molécules pourront être testées dans un *modèle animal adapté* qui puisse reproduire les conditions liées à la pathologie infectieuse ciblée, retrouvées dans l'hôte. Par la suite la *galénique* pourrait améliorer certaines propriétés, d'absorption notamment afin d'*améliorer la biodisponibilité des principes actifs*.

Enfin, dans un contexte de recherche et développement industriel, la stratégie de thérapie combinatoire présente un avantage certain en permettant d'offrir une deuxième jeunesse aux « anciennes » molécules. En effet le « pipeline » de nouveaux



antimicrobiens s'appauvri avec le temps car les compagnies pharmaceutiques investissent de moins en moins dans le développement de nouveaux antimicrobiens. Le marché de l'ATB ne garantit pas un retour sur investissement suffisant car la durée de traitement est courte et les nouvelles molécules ne sont pas prescrites en première intention, cela a certes pour conséquence de retarder l'apparition de résistance, mais limite grandement le taux de profit (395). D'ailleurs une unité appelée « *valeur actuelle net* » ou encore « net present value » (*NPV*) par les anglo-saxons a été développée pour les industries pharmaceutiques afin de déterminer le meilleur investissement à un temps donné. Le NPV est une mesure ajustée en fonction du risque des revenus futurs prévus pour un médicament et qui tient compte de l'investissement en recherche et développement initial, ainsi que des dépenses futures projetées. Pour un ATB cette valeur se situe aux alentours de 100, alors que pour un médicament contre le cancer ou une maladie neurodégénérative les valeurs NPV sont respectivement aux alentours de 300 et de 700. Il est donc urgent de trouver des solutions alternatives pour limiter la consommation d'ATB en médecine vétérinaire tout en assurant un retour sur investissement aux industriels afin qu'ils financent le développement de thérapies alternatives. Dans ce contexte, le développement des dérivés polyamino-isopréniques pourrait représenter un *avantage pour l'industrie* qui investit dans le développement d'une molécule présentant un *profil thérapeutique double*.

## Chapitre IV. Conclusion

La réduction de la consommation d'ATBs dans les élevages s'inscrit dans une démarche internationale de lutte contre l'antibiorésistance. En effet ce fléau ne possède pas de frontières géographiques ni de barrières d'espèces, et c'est avec les nombreuses initiatives engagées ces dernières années qu'a émergé le concept d'une santé unique, « *one health* ». L'expansion des résistances aux nouvelles classes d'ATBs notamment, et particulièrement chez les BGN conduit les cliniciens vers des impasses thérapeutiques certaines. Pour faire face à ce problème majeur de santé publique une mobilisation internationale a vu le jour, qui s'est traduit en France par la mise en place de plans nationaux visant à sauvegarder les ATBs en médecine humaine mais aussi en médecine vétérinaire.

Ce travail de thèse a permis d'apporter une solution à la fois à la surconsommation d'ATBs en médecine vétérinaire mais également un nouvel outil de lutte contre les résistances bactérienne, notamment en adressant la résistance intrinsèque des BGN. Face au faible renouvellement de molécules ATBs sur le marché ces dernières décennies, nous avons développé le principe de *thérapie combinatoire* afin de potentialiser l'activité des ATBs déjà existants par des molécules adjuvantes.

Dans ce contexte, les *molécules polyaminées* utilisées en combinaison avec des ATBs représentent une approche thérapeutique prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes. En effet, leurs structures souvent amphiphiles et protonnables leur permettent d'interagir avec les membranes et d'altérer leur structure et / ou les fonctions qu'ils lui sont associées tels que la FPM et / ou les systèmes d'efflux. Ces molécules sont donc capables de *moduler la résistance bactérienne* ce qui permet de potentialiser l'activité de nombreux ATBs. Par ailleurs nous avons également mis en évidence que ces molécules pouvaient agir sur la virulence bactérienne en inhibant la mobilité, celle-ci étant largement impliquée dans les phases initiales de la colonisation, le potentiel thérapeutique de ces molécules pourrait donc être élargi à *l'inhibition de la virulence bactérienne*.

## Chapitre V.

### Références bibliographiques

1. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*. 18 févr 2005;365(9459):579-87.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge: time to react [Internet]. Stockholm; 2009. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2009/11/WC500008887.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500008887.pdf)
3. ANSES A, Sécurité publique France. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable [Internet]. 2016 nov. Disponible sur: [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Bien-utiliser-les-antibiotiques/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Antibiotiques/Bien-utiliser-les-antibiotiques/(offset)/0)
4. ANSES. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015 [Internet]. 2016 oct. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2015.pdf>
5. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 1 févr 2004;23(2):113-9.
6. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. janv 2011;24(1):71-109.
7. Toutain P. Le médicament vétérinaire et le médicament humain : similitudes, différences et enjeux de santé publique. In Toulouse; 2007. Disponible sur: [http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/ppt/final\\_med\\_veto\\_site\\_2007-2.ppt](http://physiologie.envt.fr/spip/IMG/ppt/final_med_veto_site_2007-2.ppt).
8. ANSES. Index des Médicaments Vétérinaires autorisés en France - Doxycycline [Internet]. Disponible sur: <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=PULMODOX+500+MG%2FG+GRANULES+POUR+SOLUTION+BUVABLE+POUR+PORCS%2C+POULETS+ET+DINDES>
9. ANSES. Index des Médicaments Vétérinaires autorisés en France - Florfénicol [Internet]. Disponible sur: <http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=FLORGANE+300+MG%2FML+SUSPENSION+INJECTABLE+POUR+BOVINS+ET+PORCINS>
10. Madec J-Y, Gay E. Antibiorésistance : le passage animal - Homme, mythe ou réalité ? 2012;50\_52.
11. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*. août 2001;32(3-4):201-25.
12. Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Plan EcoAntibio 2012-2017. 2012.
13. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol*. août 2013;303(6-7):293-7.
14. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. août 2013;303(6-7):287-92.
15. Davies JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. *Ciba Found Symp*. 1997;207:15-27-35.
16. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2000;44(7):1771-7.
17. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. janv 2015;13(1):42-51.
18. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.

Microbiol Mol Biol Rev MMBR. déc 2003;67(4):593-656.

19. Obst S, Kastowsky M, Bradaczek H. Molecular dynamics simulations of six different fully hydrated monomeric conformers of Escherichia coli re-lipopolysaccharide in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup>. Biophys J. mars 1997;72(3):1031-46.
20. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev. sept 1992;56(3):395-411.
21. Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Clin Microbiol Rev. 1 avr 2006;19(2):382-402.
22. Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. Drug Resist Updat. sept 2016;28:13-27.
23. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. avr 2010;8(4):251-9.
24. Bolla J-M, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, et al. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. FEBS Lett. 6 juin 2011;585(11):1682-90.
25. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat Rev Microbiol. oct 2015;13(10):605-19.
26. Zgurskaya HI, López CA, Gnanakaran S. Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. ACS Infect Dis. 13 nov 2015;1(11):512-22.
27. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. Front Microbiol. 2014;4:422.
28. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol. 2002;56:17-38.
29. Pagès J-M, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. déc 2008;6(12):893-903.
30. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev. 29 juill 2005;57(10):1486-513.
31. Walsh F, Amyes SGB. Carbapenem Resistance in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Chemother. 1 août 2007;19(4):376-81.
32. Masi M, Pagès J-M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the OmpF/C - TolC Case. Open Microbiol J. 2013;7:22-33.
33. Dé E, Baslé A, Jaquinod M, Saint N, Malléa M, Molle G, et al. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. Mol Microbiol. 1 juill 2001;41(1):189-98.
34. Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in Escherichia coli. Mol Microbiol. juin 1996;20(5):911-7.
35. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. Microorganisms. 2016;4(1).
36. Bambeke FV, Michot J-M, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. J Antimicrob Chemother. 1 mai 2003;51(5):1067-77.

37. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1980;77(7):3974-7.
38. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 sept 2000;44(9):2242-6.
39. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 10 oct 2002;419(6907):587-93.
40. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*. 22 juin 2000;405(6789):914-9.
41. Kim J-S, Jeong H, Song S, Kim H-Y, Lee K, Hyun J, et al. Structure of the tripartite multidrug efflux pump AcrAB-TolC suggests an alternative assembly mode. *Mol Cells*. 2015;38(2):180-6.
42. Nikaido H, Pagès J-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1 mars 2012;36(2):340-63.
43. Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol*. déc 2004;14(6):741-7.
44. Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH, Turner RJ, Weiner JH, et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol*. 1 mars 1996;19(6):1167-75.
45. Ma C, Chang G. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 mars 2004;101(9):2852-7.
46. Nasie I, Steiner-Mordoch S, Schuldiner S. New substrates on the block: clinically relevant resistances for EmrE and homologues. *J Bacteriol*. déc 2012;194(24):6766-70.
47. Kikukawa T, Nara T, Arais T, Miyauchi S, Kamo N. Two-component bacterial multidrug transporter, EbrAB: Mutations making each component solely functional. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. mai 2006;1758(5):673-9.
48. Nasie I, Steiner-Mordoch S, Gold A, Schuldiner S. Topologically random insertion of EmrE supports a pathway for evolution of inverted repeats in ion-coupled transporters. *J Biol Chem*. 14 mai 2010;285(20):15234-44.
49. Li X-Z, Poole K, Nikaido H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2003;47(1):27-33.
50. Morita Y, Kodama K, Shiota S, Mine T, Kataoka A, Mizushima T, et al. NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 1998;42(7):1778-82.
51. Long F, Rouquette-Loughlin C, Shafer WM, Yu EW. Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 sept 2008;52(9):3052-60.
52. Saier MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WH, Huang SC, et al. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. nov 1999;1(2):257-79.
53. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*. oct 1996;178(20):5853-9.
54. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: The power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mars 2009;10(3):218-27.
55. Fath MJ, Kolter R. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*. déc

1993;57(4):995-1017.

56. Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* mai 2001;152(3-4):205-10.
57. Bolhuis H, Veen HW van, Brands JR, Putman M, Poolman B, Driessen AJM, et al. Energetics and Mechanism of Drug Transport Mediated by the Lactococcal Multidrug Transporter LmrP. *J Biol Chem.* 27 sept 1996;271(39):24123-8.
58. Thomson KS, Smith Moland E. Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes Infect.* août 2000;2(10):1225-35.
59. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 16 mai 1980;289(1036):321-31.
60. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 1989;33(3):259-63.
61. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juin 1995;39(6):1211-33.
62. Livermore DM. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.* août 1987;6(4):439-45.
63. Lavigne J-P, Bouziges N, Chanal C, Mahamat A, Michaux-Charachon S, Sotto A. Molecular Epidemiology of Enterobacteriaceae Isolates Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in a French Hospital. *J Clin Microbiol.* 1 août 2004;42(8):3805-8.
64. Poirel L, Mammeri H, Nordmann P. TEM-121, a Novel Complex Mutant of TEM-Type  $\beta$ -Lactamase from *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 déc 2004;48(12):4528-31.
65. Barthélémy P, Autissier D, Gerbaud G, Courvalin P. Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. A new mechanism of resistance. *J Antibiot (Tokyo).* déc 1984;37(12):1692-6.
66. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 1 oct 1999;2(5):499-503.
67. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev.* nov 2004;28(5):519-42.
68. Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* avr 2001;7(2):337.
69. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2000;44(6):1549.
70. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 juin 2001;65(2):232-60.
71. Lesage M. Les antibiotiques en élevage: vers des solutions intégrées. Centre d'étude et de prospective: Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt; Report No.: n°82, septembre 2015.
72. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* juin 2001;17(6):431-7.
73. Afssa. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine [Internet]. 2006 janv. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-ABR.pdf>



74. Vandaële E. Le lien entre l'usage d'antibiotiques et l'antibiorésistance est-il établi ? Le point vétérinaire, n°331 [Internet]. 12 janv 2012; Disponible sur: <http://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article-rural/n-331/le-lien-entre-l-usage-d-antibiotiques-et-l-antibioresistance-est-il-etabli.html>
75. Dupraz P. Interdiction des promoteurs de croissance antibiotiques et commerce international. In 2004. p. 151-8.
76. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* sept 2003;35(1):32-40.
77. Goodnow RA. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 1 déc 1980;44(4):722-38.
78. Richter GW, Kress Y. Electron Microscopy of a Strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1 oct 1967;94(4):1216-24.
79. Plotkin BJ, Bemis DA. Carbon source utilisation by *Bordetella bronchiseptica*. *J Med Microbiol.* 1998;47(9):761-5.
80. Bemis DA, Carmichael LE, Appel MJ. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet.* avr 1977;67(2):282-93.
81. Cross RF. *Bordetella bronchiseptica*-induced porcine atrophic rhinitis. *J Am Vet Med Assoc.* 15 déc 1962;141:1467-8.
82. Tørnøe N, Nielsen NC, Svendsen J. *Bordetella bronchiseptica* isolations from the nasal cavity of pigs in relation to atrophic rhinitis. *Nord Vet Med.* janv 1976;28(1):1-18.
83. Woolfrey BF, Moody JA. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 1991;4(3):243-55.
84. Gueirard P, Weber C, Coustumier AL, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol.* 1 août 1995;33(8):2002-6.
85. Ner Z, A. Ross L, Horn MV, Keens TG, MacLaughlin EF, Starnes VA, et al. *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 1 oct 2003;7(5):413-7.
86. Uhl MA, Miller JF. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 févr 1994;91(3):1163.
87. Uhl MA, Miller JF. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 1 mars 1996;15(5):1028.
88. Stibitz S, Yang MS. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1 juill 1991;173(14):4288-96.
89. Aricó B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, et al. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1989;86(17):6671.
90. Dupré E. La régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis* : BvgS, modèle original de capteur de système à deux composants [Internet] [phdthesis]. Université du Droit et de la Santé - Lille II; 2013 [cité 18 oct 2016]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01138645/document>
91. Coote JG. Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* nov 1991;137(11):2493-503.

92. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzmán CA. A Second Two-Component Regulatory System of *Bordetella bronchiseptica* Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence. *Infect Immun.* oct 1998;66(10):4640.
93. Mattoo S, Cherry JD. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 1 avr 2005;18(2):326-82.
94. Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, et al. Pertactin Is Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect Immun.* 1 juill 2010;78(7):2901-9.
95. Guo Q, Shen Y, Lee Y-S, Gibbs CS, Mrksich M, Tang W-J. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* 21 sept 2005;24(18):3190-201.
96. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol.* 1 févr 2001;4(1):82-9.
97. Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, et al. Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. *Infect Immun.* 1 janv 1991;59(1):337-45.
98. Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF. Species- and Strain-Specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol.* 1 mars 2006;188(5):1775-85.
99. Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF. The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1 févr 1992;174(3):980-90.
100. Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *bordetella*-host interaction. *Cell.* 24 févr 1995;80(4):611-20.
101. Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol.* 1 janv 2002;291(8):605-14.
102. Giardina PC, Foster LA, Musser JM, Akerley BJ, Miller JF, Dyer DW. *bvg* Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. *J Bacteriol.* nov 1995;177(21):6058-63.
103. Brickman TJ, Armstrong SK. Alcaligin Siderophore Production by *Bordetella bronchiseptica* Strain RB50 Is Not Repressed by the *BvgAS* Virulence Control System. *J Bacteriol.* 15 déc 2002;184(24):7055-7.
104. Pasteur L. De l'atténuation du virus du choléra des poules [Internet]. 1880 oct. Disponible sur: [http://www.academie-sciences.fr/archivage\\_site/fondations/lp\\_pdf/CR1880\\_p673.pdf](http://www.academie-sciences.fr/archivage_site/fondations/lp_pdf/CR1880_p673.pdf)
105. Rosner H, Grimmecke HD, Knirel YA, Shashkov AS. Hyaluronic acid and a (1---4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. *Carbohydr Res.* janv 1992;223:329-33.
106. Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol.* 29 sept 2000;83(1-2):153-60.
107. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida*: from Zoonosis to Cellular Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 2013;26(3):631-55.
108. DeAngelis PL, White CL. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D. *J Biol Chem.* 1 mars 2002;277(9):7209-13.
109. Rimler RB, Rhoades KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol.* avr 1987;25(4):615.

110. DeAngelis PL, Gunay NS, Toida T, Mao W, Linhardt RJ. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. *Carbohydr Res.* 27 sept 2002;337(17):1547-52.
111. Harper M, Boyce JD, Adler B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;361:39-51.
112. Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett.* déc 2006;265(1):1-10.
113. Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* sept 1972;16(4):925-36.
114. Muhairwa AP, Christensen JP, Bisgaard M. Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. *Avian Pathol J WVPA.* avr 2000;29(2):133-42.
115. Blackall P, Pahoff J, Marks D, Fegan N, Morrow C. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from fowl cholera outbreaks on turkey farms. *Aust Vet J.* 1 avr 1995;72(4):135-8.
116. Descamps S, Jenouvrier S, Gilchrist HG, Forbes MR. Avian Cholera, a Threat to the Viability of an Arctic Seabird Colony? Ropert-Coudert Y, éditeur. *PLoS ONE.* 15 févr 2012;7(2):e29659.
117. Strugnell BW, Dagleish MP, Bayne CW, Brown M, Ainsworth HL, Nicholas RAJ, et al. Investigations into an outbreak of corvid respiratory disease associated with *Pasteurella multocida*. *Avian Pathol.* 1 juin 2011;40(3):329-36.
118. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* déc 2007;8(2):129-50.
119. Dyer NW, Ward AC, Weiser GC, White DG. Seasonal incidence and antibiotic susceptibility patterns of *Pasteurellaceae* isolated from American bison (*Bison bison*). *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.* janv 2001;65(1):7-14.
120. Rhodes MB, New CW, Baker PK, Hogg A, Underdahl NR. *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida* as agents of severe atrophic rhinitis of swine. *Vet Microbiol.* févr 1987;13(2):179-87.
121. Lewis KT, Stiles M. Management of cat and dog bites. *Am Fam Physician.* août 1995;52(2):479-85, 489-90.
122. Oehler RL, Velez AP, Mizrachi M, Lamarche J, Gompf S. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. *Lancet Infect Dis.* juill 2009;9(7):439-47.
123. Pedersen KB, Barfod K. The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. *Nord Vet Med.* déc 1981;33(12):513-22.
124. Chanter N, Magyar T, Rutter JM. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res Vet Sci.* juill 1989;47(1):48-53.
125. Cowart RP, Bäckström L, Brim TA. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis and pneumonia in swine. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.* juill 1989;53(3):295-300.
126. Horiguchi Y. Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotic* toxin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;361:113-29.
127. Kureljušić B, Weissenbacher-Lang C, Nedorost N, Stixenberger D, Weissenböck H. Association between *Pneumocystis* spp. and co-infections with *Bordetella*

- bronchiseptica, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* in Austrian pigs with pneumonia. *Vet J Lond Engl* 1997. janv 2016;207:177-9.
128. Kielstein P. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella-multocida*-strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B*. août 1986;33(6):418-24.
129. Davies RL, MacCorquodale R, Baillie S, Caffrey B. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J Med Microbiol*. janv 2003;52(Pt 1):59-67.
130. Deeb BJ, DiGiacomo RF, Bernard BL, Silbernagel SM. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J Clin Microbiol*. janv 1990;28(1):70-5.
131. Rf D, Bj D, Jr GW, Bl B, Mm C. Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res*. 1989 1989;50(9):1460-5.
132. DiGiacomo RF, Deeb BJ, Brodie SJ, Zimmerman TE, Veltkamp ER, Chrisp CE. Toxin production by *Pasteurella multocida* isolated from rabbits with atrophic rhinitis. *Am J Vet Res*. août 1993;54(8):1280-6.
133. Wilson BA, Ho M. *Pasteurella multocida* toxin. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 430-47. Disponible sur: [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=gFol3jKI03EC&oi=fnd&pg=PA430&dq=Wilson+BA+2006+multocida&ots=uChYta0BOh&sig=OdHGFA0\\_uYyQ4YuV\\_7U62NxMZKk#v=onepage&q&f=false](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=gFol3jKI03EC&oi=fnd&pg=PA430&dq=Wilson+BA+2006+multocida&ots=uChYta0BOh&sig=OdHGFA0_uYyQ4YuV_7U62NxMZKk#v=onepage&q&f=false)
134. Chanter N, Rutter JM. Colonisation by *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs and immunity to the osteolytic toxin. *Vet Microbiol*. nov 1990;25(2-3):253-65.
135. Felix R, Fleisch H, Frandsen PL. Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption in vitro. *Infect Immun*. déc 1992;60(12):4984-8.
136. Mullan PB, Lax AJ. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. oct 1998;63(4):340-5.
137. Ramdani null, Dawkins HJ, Johnson RB, Spencer TL, Adler B. *Pasteurella multocida* infections in mice with reference to haemorrhagic septicaemia in cattle and buffalo. *Immunol Cell Biol*. févr 1990;68 ( Pt 1):57-61.
138. Dendle C, Looke D. Review article: Animal bites: an update for management with a focus on infections. *Emerg Med Australas EMA*. déc 2008;20(6):458-67.
139. Garcia VF. Animal bites and *Pasteurella* infections. *Pediatr Rev*. avr 1997;18(4):127-30.
140. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC. *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. mai 1984;63(3):133-54.
141. Jones AG, Lockton JA. Fatal *Pasteurella multocida* septicaemia following a cat bite in a man without liver disease. *J Infect*. nov 1987;15(3):229-35.
142. Desai SS, Groves RJ, Glew R. Subacute *Pasteurella* osteomyelitis of the hand following dog bite. *Orthopedics*. juin 1990;13(6):653-6.
143. Guion TL, Sculco TP. *Pasteurella multocida* infection in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 1 juin 1992;7(2):157-60.
144. Khan MF, Movahed MR, Jung J. *Pasteurella multocida* endocarditis. *J Heart Valve Dis*. mars 2012;21(2):260-2.
145. Hombal SM, Dincsoy HP. *Pasteurella multocida* endocarditis. *Am J Clin Pathol*. déc 1992;98(6):565-8.
146. Levin JM, Talan DA. Erythromycin failure with subsequent *Pasteurella Multocida*

- meningitis and septic arthritis in a cat-bite victim. *Ann Emerg Med.* 1 déc 1990;19(12):1458-61.
147. Klein NC, Cunha BA. *Pasteurella multocida* pneumonia. *Semin Respir Infect.* mars 1997;12(1):54-6.
148. Drabick MJJ, Gasser Jr. LCRA, Saunders NB, Hadfield MTL, Rogers CLC, Berg MBW, et al. *Pasteurella multocida* Pneumonia in a Man With AIDS and Nontraumatic Feline Exposure. *Chest.* janv 1993;103(1):7-11.
149. Sugino Y, Kato M, Yagi A, Kawabata A. [*Pasteurella multocida* pneumonia with molecular evidence of zoonotic transmission]. *Kansenshogaku Zasshi.* nov 2007;81(6):726-30.
150. Boyce JD, Adler B. How does *Pasteurella multocida* respond to the host environment? *Curr Opin Microbiol.* févr 2006;9(1):117-22.
151. Carter GR, Chengappa MM. Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *J Clin Microbiol.* 1 janv 1980;11(1):94-6.
152. Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb Pathog.* 1 juill 2000;29(1):25-38.
153. Paustian ML, May BJ, Kapur V. *Pasteurella multocida* Gene Expression in Response to Iron Limitation. *Infect Immun.* 1 juin 2001;69(6):4109-15.
154. Harper M, Boyce JD, Cox AD, Michael FS, Wilkie IW, Blackall PJ, et al. *Pasteurella multocida* Expresses Two Lipopolysaccharide Glycoforms Simultaneously, but Only a Single Form Is Required for Virulence: Identification of Two Acceptor-Specific Heptosyl I Transferases. *Infect Immun.* 1 août 2007;75(8):3885-93.
155. Harper M, St Michael F, John M, Vinogradov E, Adler B, Boyce JD, et al. *Pasteurella multocida* Heddleston serovars 1 and 14 express different lipopolysaccharide structures but share the same lipopolysaccharide biosynthesis outer core locus. *Vet Microbiol.* 2 juin 2011;150(3-4):289-96.
156. Harper M, Cox AD, Michael FS, Wilkie IW, Boyce JD, Adler B. A Heptosyltransferase Mutant of *Pasteurella multocida* Produces a Truncated Lipopolysaccharide Structure and Is Attenuated in Virulence. *Infect Immun.* 1 juin 2004;72(6):3436-43.
157. Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddsi M, et al. Role of Capsule in the Pathogenesis of Fowl Cholera Caused by *Pasteurella multocida* Serogroup A. *Infect Immun.* 1 avr 2001;69(4):2487-92.
158. Boyce JD, Adler B. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun.* 1 juin 2000;68(6):3463-8.
159. Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 29 juill 2010;144(1-2):1-17.
160. Dabo SM, Confer AW, Hartson SD. Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Vet Microbiol.* 31 oct 2005;110(3-4):265-75.
161. Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb Pathog.* oct 2003;35(4):147-57.
162. Pullinger GD, Bevir T, Lax AJ. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol Microbiol.* 1 janv 2004;51(1):255-69.
163. Wilson BA, Ho M. Cellular and molecular action of the mitogenic protein-

- deamidating toxin from *Pasteurella multocida*. FEBS J. déc 2011;278(23):4616-32.
164. Preuß I, Hildebrand D, Orth JHC, Aktories K, Kubatzky KF. *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. Cell Microbiol. 1 août 2010;12(8):1174-85.
165. Pattison IH, Howell DG, Elliot J. A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. J Comp Pathol. oct 1957;67(4):320-30.
166. Bertschinger HU, Seifert P. Isolation of *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumonia. In Zagreb, Yugoslavia.; 1978.
167. Shope RE. PORCINE CONTAGIOUS PLEUROPNEMONIA : I. EXPERIMENTAL TRANSMISSION, ETIOLOGY, AND PATHOLOGY. J Exp Med. 29 févr 1964;119(3):357.
168. POHL S, BERTSCHINGER HU, FREDERIKSEN W, MANNHEIM W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. Int J Syst Evol Microbiol. 1983;33(3):510-4.
169. Matthews PR, Pattison IH. The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. J Comp Pathol. janv 1961;71:44-52.
170. Niven DF, Levesque M. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). Int J Syst Evol Microbiol. 1988;38(3):319-320.
171. Blackall PJ, Klaasen HLBM, Van Den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet Microbiol. 3 janv 2002;84(1-2):47-52.
172. Perry MB, Altman E, Brisson J-R, Beynon LM, Richards JC. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains. Serodiagn Immunother Infect Dis. 1 août 1990;4(4):299-308.
173. Grasteau A. Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [Université de Montréal]; 2011.
174. RYCROFT AN, GARSIDE LH. *Actinobacillus* Species and their Role in Animal Disease. Vet J. 1 janv 2000;159(1):18-36.
175. Negrete-Abascal E, Reyes ME, García RM, Vaca S, Girón JA, García O, et al. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Bacteriol. 15 janv 2003;185(2):664-8.
176. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes Infect. févr 2002;4(2):225-35.
177. Torremorell M, Pijoan C, Janni K, Walker R, Joo HS. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. Am J Vet Res. août 1997;58(8):828-32.
178. Jobert JL, Savoye C, Cariolet R, Kobisch M, Madec F. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. Can J Vet Res. janv 2000;64(1):21.
179. Rogers R, Eaves L, Blackall P, Truman K. The comparative pathogenicity of four serovars of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. Aust Vet J. 1 janv 1990;67(1):9-12.
180. Hensel A, Windt H, Stockhofe-Zurwieden N, Lödding H, Koch W, Petzoldt K. A Porcine Aerosol Infection Model for Studying Dose Dependent Effects Caused by

- Actinobacillus pleuropneumoniae Bacteria. J Aerosol Med. 1 janv 1993;6(2):73-88.
181. Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. J Vet Med Sci. avr 1996;58(4):297-303.
182. Bertram TA. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by Haemophilus pleuropneumoniae. Vet Pathol. nov 1985;22(6):598-609.
183. Jacques M, Foiry B, Higgins R, Mittal KR. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of Actinobacillus pleuropneumoniae. J Bacteriol. juill 1988;170(7):3314.
184. Inzana TJ, Ma J, Workman T, Gogolewski RP, Anderson P. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae serotype 5. Infect Immun. août 1988;56(8):1880-9.
185. Utrera V, Pijoan C. Fimbriae in A pleuropneumoniae strains isolated from pig respiratory tracts. Vet Rec. 13 avr 1991;128(15):357-8.
186. Boekema BKHL, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP, Verheijden JH. Adherence of Actinobacillus pleuropneumoniae to primary cultures of porcine lung epithelial cells. Vet Microbiol. 19 mai 2003;93(2):133-44.
187. Ramjeet M, Deslandes V, Michael FS, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, et al. Truncation of the Lipopolysaccharide Outer Core Affects Susceptibility to Antimicrobial Peptides and Virulence of Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 1. J Biol Chem. 25 nov 2005;280(47):39104-14.
188. Chung JW, Ng-Thow-Hing C, Budman LI, Gibbs BF, Nash JHE, Jacques M, et al. Outer membrane proteome of Actinobacillus pleuropneumoniae: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. PROTEOMICS. 1 juin 2007;7(11):1854-65.
189. Chiers K, De Waele T, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Virulence factors of Actinobacillus pleuropneumoniae involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. Vet Res. sept 2010;41(5):65.
190. Bélanger M, Bégin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of Actinobacillus pleuropneumoniae bind pig hemoglobin. Infect Immun. 1 févr 1995;63(2):656-62.
191. Deslandes V, Nash JH, Harel J, Coulton JW, Jacques M. Transcriptional profiling of Actinobacillus pleuropneumoniae under iron-restricted conditions. BMC Genomics. 2007;8(1):72.
192. Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, et al. Actinobacillus pleuropneumoniae RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. J Gen Microbiol. août 1993;139(8):1723-8.
193. Frey J. Virulence in Actinobacillus pleuropneumoniae and RTX toxins. Trends Microbiol. 1 juill 1995;3(7):257-61.
194. Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JI, et al. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of Actinobacillus pleuropneumoniae. Microbiology. 1999;145(8):2105-16.
195. Lone AG, Deslandes V, Nash JHE, Jacques M, MacInnes JI. Modulation of gene expression in Actinobacillus pleuropneumoniae exposed to bronchoalveolar fluid. PLoS One. 3 juill 2009;4(7):e6139.
196. Liu J, Chen X, Tan C, Guo Y, Chen Y, Fu S, et al. In vivo induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of Actinobacillus pleuropneumoniae. Vet Microbiol. 12 juin 2009;137(3-4):282-9.
197. Fenwick BW, Osburn BI. Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and

- immunized pigs. *Infect Immun.* nov 1986;54(2):575-82.
198. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 1992;29(3):245-77.
199. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2000;44(9):2242-6.
200. Sanchez-Pescador R, Brown JT, Roberts M, Urdea MS. Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance. *Nucleic Acids Res.* 11 févr 1988;16(3):1218.
201. Trieber CA, Burkhardt N, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biol Chem.* juill 1998;379(7):847-55.
202. Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci.* 1 avr 2002;72(2):87-93.
203. Leclercq R, Courvalin P. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1991;35(7):1273.
204. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1991;35(7):1267.
205. Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. Identification of a Plasmid-Borne Chloramphenicol-Florfenicol Resistance Gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 2000;44(9):2530-3.
206. Kehrenberg C, Schwarz S, Jacobsen L, Hansen LH, Vester B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol.* 1 août 2005;57(4):1064-73.
207. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 juill 2006;50(7):2500-5.
208. Meier A, Kirschner P, Springer B, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, et al. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 1994;38(2):381.
209. Stone GG, Shortridge D, Flamm RK, Versalovic J, Beyer J, Idler K, et al. Identification of a 23S rRNA Gene Mutation in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 1 déc 1996;1(4):227-8.
210. Mamelli L, Prouzet-Mauléon V, Pagès J-M, Mégraud F, Bolla J-M. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *J Antimicrob Chemother.* sept 2005;56(3):491-7.
211. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 1999;43(12):2823.
212. Fontana R, Ligozzi M, Pittaluga F, Satta G. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb Drug Resist Larchmt N.* 1996;2(2):209-13.
213. Chambers HF. Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J Infect Dis.* mars 1999;179 Suppl 2:S353-359.
214. Jeanteur D, Schirmer T, Fourel D, Simonet V, Rummel G, Widmer C, et al. Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 oct 1994;91(22):10675-9.



215. Goldberg E, Bishara J. Contemporary unconventional clinical use of cotrimoxazole. *Clin Microbiol Infect.* janv 2012;18(1):8-17.
216. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* mai 2001;32(3/4):261-73.
217. Rådström P, Swedberg G, Sköld O. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 sept 1991;35(9):1840-8.
218. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 févr 1995;39(2):279-89.
219. Rouch DA, Messerotti LJ, Loo LSL, Jackson CA, Skurray RA. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol Microbiol.* 1 févr 1989;3(2):161-75.
220. Flensburg J, Sköld O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *Eur J Biochem.* 1 févr 1987;162(3):473-6.
221. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat.* 1 févr 1999;2(1):38-55.
222. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int J Antimicrob Agents.* mai 2005;25(5):358-73.
223. Piddock LJV, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ. Evidence for an Efflux Pump Mediating Multiple Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 nov 2000;44(11):3118-21.
224. Poole K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 oct 2000;44(10):2595-9.
225. Fábrega A, Madurga S, Giralte E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* janv 2009;2(1):40-61.
226. Poulidakos P, Falagas ME. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opin Pharmacother.* août 2013;14(12):1585-97.
227. Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.* 1 juin 1997;5(6):234-40.
228. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1 mars 1993;57(1):138-63.
229. Chaslus-Dancla E, Glupczynski Y, Gerbaud G, Lagorce M, Lafont JP, Courvalin P. Detection of apramycin resistant Enterobacteriaceae in hospital isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 15 oct 1989;52(3):261-5.
230. Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P. Involvement of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 nov 1999;43(11):2624-8.
231. Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* Is an Aminoglycoside Efflux Pump. *J Bacteriol.* 15 mars 2000;182(6):1754-6.
232. Cannon M, Harford S, Davies J. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 1990;26(3):307-17.
233. Murray IA, Shaw WV. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other

- natural products. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 1997;41(1):1-6.
234. Lovett PS. Translational attenuation as the regulator of inducible cat genes. *J Bacteriol.* 1 janv 1990;172(1):1-6.
235. Pradel E, Pagès J-M. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2002;46(8):2640-3.
236. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* avr 2001;3(2):255-64.
237. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 1 déc 1996;60(4):575-608.
238. Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 1 mai 2005;55(5):776-9.
239. Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2006;2(1):e7.
240. Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *J Antimicrob Chemother.* 1 févr 2007;59(2):191-6.
241. Cloeckaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel J-L, et al. Plasmid-Mediated Florfenicol Resistance Encoded by the floR Gene in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 oct 2000;44(10):2858-60.
242. White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, et al. Characterization of Chloramphenicol and Florfenicol Resistance in *Escherichia coli* Associated with Bovine Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1 déc 2000;38(12):4593-8.
243. Arcangioli MA, Leroy-Sétrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 15 mai 1999;174(2):327-32.
244. Kehrenberg C, Schwarz S. fexA, a Novel *Staphylococcus lentus* Gene Encoding Resistance to Florfenicol and Chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 févr 2004;48(2):615-8.
245. Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS. Novel Florfenicol and Chloramphenicol Resistance Gene Discovered in Alaskan Soil by Using Functional Metagenomics. *Appl Environ Microbiol.* 1 août 2010;76(15):5321-6.
246. Tao W, Lee MH, Wu J, Kim NH, Kim J-C, Chung E, et al. Inactivation of Chloramphenicol and Florfenicol by a Novel Chloramphenicol Hydrolase. *Appl Environ Microbiol.* 1 sept 2012;78(17):6295-301.
247. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med.* 7 juin 1985;78(6A):3-21.
248. Thiolas A, Bornet C, Davin-Régli A, Pagès J-M, Bollet C. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 mai 2004;317(3):851-6.
249. Philippe N, Maigne L, Santini S, Pinet E, Claverie J-M, Davin-Régli A-V, et al. In Vivo Evolution of Bacterial Resistance in Two Cases of *Enterobacter aerogenes* Infections during Treatment with Imipenem. *PLOS ONE.* 23 sept 2015;10(9):e0138828.
250. Chen DZ, Patel DV, Hackbarth CJ, Wang W, Dreyer G, Young DC, et al. Actinonin, a Naturally Occurring Antibacterial Agent, Is a Potent Deformylase Inhibitor.

- Biochemistry (Mosc). 1 févr 2000;39(6):1256-62.
251. Giglione C, Pierre M, Meinnel T. Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol.* juin 2000;36(6):1197-205.
252. Stokes NR, Sievers J, Barker S, Bennett JM, Brown DR, Collins I, et al. Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem.* 2 déc 2005;280(48):39709-15.
253. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov.* janv 2007;6(1):29-40.
254. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski L da S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 [cité 28 oct 2016];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00353/abstract>
255. Vizioli J, Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci.* 1 nov 2002;23(11):494-6.
256. Lohner K, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 15 déc 1999;1462(1-2):141-56.
257. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* mars 2005;3(3):238-50.
258. Fritz JH, Brunner S, Birnstiel ML, Buschle M, Gabain A v, Mattner F, et al. The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. *Vaccine.* 3 sept 2004;22(25-26):3274-84.
259. Peschel A, Sahl H-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol.* juill 2006;4(7):529-36.
260. Dorner F, Lienkamp K. CHAPTER 5: Polymer-Based Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides (SMAMPs) – A New Class of Nature-Inspired Antimicrobial Agents with Low Bacterial Resistance Formation Potential. In 2013 [cité 29 oct 2016]. p. 97-138. Disponible sur: <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849738071-00097/978-1-84973-807-1>
261. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* déc 2006;24(12):1551-7.
262. Tew GN, Scott RW, Klein ML, DeGrado WF. De Novo Design of Antimicrobial Polymers, Foldamers, and Small Molecules: From Discovery to Practical Applications. *Acc Chem Res.* 19 janv 2010;43(1):30-9.
263. Sabouri Ghannad M, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. *Iran J Basic Med Sci.* mars 2012;15(2):693-701.
264. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci.* 1 avr 2003;82(4):640-7.
265. Mathur MD, Vidhani S, Mehndiratta PL. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *J Assoc Physicians India.* juin 2003;51:593-6.
266. Inal JM. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51(4):237-44.
267. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, et al.

- Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother.* 1 janv 2005;11(5):211-9.
268. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: Facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* 15 févr 2006;296(1):5-14.
269. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. Fox D, éditeur. *PLoS ONE.* 29 août 2007;2(8):e799.
270. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* déc 2008;81(4):591-606.
271. Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res.* oct 2016;191:51-80.
272. Dabour N, Zihler A, Kheadr E, Lacroix C, Fliss I. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 15 août 2009;133(3):225-33.
273. Lohans CT, Vederas JC. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. *Int J Microbiol.* 2012;2012:1-13.
274. Nishie M, Nagao J-I, Sonomoto K. Antibacterial peptides « bacteriocins »: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* mars 2012;17(1):1-16.
275. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1 juill 2012;25(3):450-70.
276. Worthington RJ, Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* mars 2013;31(3):177-84.
277. Wu P, Grainger DW. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials.* avr 2006;27(11):2450-67.
278. Lane D. Designer combination therapy for cancer. *Nat Biotechnol.* févr 2006;24(2):163-4.
279. Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature.* 19 avr 2001;410(6831):995-1001.
280. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 nov 2014;78:14-27.
281. Gill EE, Franco OL, Hancock REW. Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug-Resistant Pathogens. *Chem Biol Drug Des.* janv 2015;85(1):56-78.
282. Högberg LD, Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol Sci.* nov 2010;31(11):509-15.
283. Tay S, Yew W. Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Int J Mol Sci.* 9 août 2013;14(8):16570-99.
284. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol.* janv 2008;6(1):17-27.
285. Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Antimicrob Resist Chemother.* 2013;4:114.
286. Cirioni O, Mocchegiani F, Cacciatore I, Vecchiet J, Silvestri C, Baldassarre L, et al. Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection. *Peptides.* févr 2013;40:77-81.
287. Gerdt JP, Blackwell HE. Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. *ACS Chem*

- Biol. 17 oct 2014;9(10):2291-9.
288. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* nov 2006;4(11):811-25.
289. Gauthier A, Robertson ML, Lowden M, Ibarra JA, Puente JL, Finlay BB. Transcriptional Inhibitor of Virulence Factors in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 oct 2005;49(10):4101-9.
290. Swietnicki W, Carmany D, Retford M, Guelta M, Dorsey R, Bozue J, et al. Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* Type III secretion system YscN ATPase. *PloS One.* 2011;6(5):e19716.
291. Marshall NC, Finlay BB. Targeting the type III secretion system to treat bacterial infections. *Expert Opin Ther Targets.* 1 févr 2014;18(2):137-52.
292. Linington RG, Robertson M, Gauthier A, Finlay BB, van Soest R, Andersen RJ. Caminoside A, an antimicrobial glycolipid isolated from the marine sponge *Caminus sphaeroconia*. *Org Lett.* 14 nov 2002;4(23):4089-92.
293. Harshey RM. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57(1):249-73.
294. Mattick JS. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56(1):289-314.
295. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 juin 2005;102(26):9247-52.
296. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 21 mai 1999;284(5418):1318-22.
297. Malapaka VRR, Barrese AA, Tripp BC, Tripp BC. High-Throughput Screening for Antimicrobial Compounds Using a 96-Well Format Bacterial Motility Absorbance Assay. *J Biomol Screen.* 1 sept 2007;12(6):849-54.
298. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol.* juin 2011;7(6):348-50.
299. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol.* juin 2011;7(6):348-50.
300. Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie.* déc 2005;87(12):1137-47.
301. Van Bambeke F, Pages J-M, Lee VJ. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 1 juin 2006;1(2):157-75.
302. Pagès J-M, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med.* août 2005;11(8):382-9.
303. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV, Pagès J-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin 2007;59(6):1223-9.
304. Lewis K. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J Mol Microbiol Biotechnol.* avr 2001;3(2):247-54.
305. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. *Biochem Pharmacol.* 30 mars 2006;71(7):910-8.
306. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, et al. Use of

- a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1999;43(6):1340-6.
307. Singh R, Swick MC, Ledesma KR, Yang Z, Hu M, Zechiedrich L, et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2012;56(4):1680-5.
308. Ughachukwu P, Unekwe P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res.* juill 2012;2(2):191-8.
309. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2001;45(1):105-16.
310. Renau TE, Léger R, Filonova L, Flamme EM, Wang M, Yen R, et al. Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 18 août 2003;13(16):2755-8.
311. Thorarensen A, Presley-Bodnar AL, Marotti KR, Boyle TP, Heckaman CL, Bohanon MJ, et al. 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 23 juill 2001;11(14):1903-6.
312. Bohnert JA, Kern WV. Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2005;49(2):849.
313. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PloS One.* 2013;8(3):e60666.
314. Handzlik J, Szymańska E, Alibert S, Chevalier J, Otrębska E, Pękala E, et al. Search for new tools to combat Gram-negative resistant bacteria among amine derivatives of 5-arylidenehydantoin. *Bioorg Med Chem.* 1 janv 2013;21(1):135-45.
315. Otrębska-Machaj E, Chevalier J, Handzlik J, Szymańska E, Schabikowski J, Boyer G, et al. Efflux Pump Blockers in Gram-Negative Bacteria: The New Generation of Hydantoin Based-Modulators to Improve Antibiotic Activity. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cité 14 nov 2016];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00622/abstract>
316. Pagès J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* mai 2009;1794(5):826-33.
317. Chevalier J, Mahamoud A, Baitiche M, Adam E, Viveiros M, Smarandache A, et al. Quinazoline derivatives are efficient chemosensitizers of antibiotic activity in *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains. *Int J Antimicrob Agents.* août 2010;36(2):164-8.
318. Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2003;47(2):719.
319. Chan YY, Ong YM, Chua KL. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2007;51(2):623-30.
320. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2002;46(10):3133-41.
321. Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural

- sources. *J Antimicrob Chemother.* 1 juin 2007;59(6):1247-60.
322. Schmitz FJ, Fluit AC, Lückefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhoef J, et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloracin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1 déc 1998;42(6):807-10.
323. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the in-vitro susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 1997;40(3):458-60.
324. Ohene-Agyei T, Mowla R, Rahman T, Venter H. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *MicrobiologyOpen.* déc 2014;3(6):885-96.
325. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pages J-M, Amaral L, et al. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):2209-11.
326. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine.* nov 2009;16(11):997-1005.
327. Opperman TJ, Kwasny SM, Kim H-S, Nguyen ST, Houseweart C, D'Souza S, et al. Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2014;58(2):722.
328. Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [cité 14 nov 2016];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC4419859/>
329. Hancock RE, Wong PG. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1984;26(1):48-52.
330. Hancock RE. Peptide antibiotics. *The Lancet.* 8 févr 1997;349(9049):418-22.
331. Scott MG, Yan H, Hancock RE. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Infect Immun.* avr 1999;67(4):2005-9.
332. Savage PB. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of Gram-negative bacteria. *Ann Med.* 1 janv 2001;33(3):167-71.
333. Vaara M, Vaara T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 1983;24(1):107.
334. Morris CM, George A, Wilson WW, Champlin FR. Effect of polymyxin B nonapeptide on daptomycin permeability and cell surface properties in *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Pasteurella multocida*. *J Antibiot (Tokyo).* janv 1995;48(1):67-72.
335. Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T. Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *Int J Antimicrob Agents.* juill 2004;24(1):67-71.
336. Kwon DH, Lu C-D. Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mai 2006;50(5):1623-7.
337. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clin Infect Dis.* 1 juin 2002;34(Supplement 3):S93-106.
338. Blanchet M, Borselli D, Brunel JM. Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria? *Future Med Chem.* juin 2016;8(9):963-73.
339. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev.* mars

- 1985;49(1):81-99.
340. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 mai 2000;271(3):559-64.
341. Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Makinoshima H, et al. A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon. *J Biol Chem*. 29 oct 2004;279(44):46008-13.
342. Hafner EW, Tabor CW, Tabor H. Mutants of *Escherichia coli* that do not contain 1,4-diaminobutane (putrescine) or spermidine. *J Biol Chem*. 25 déc 1979;254(24):12419-26.
343. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J*. 15 déc 1999;344(3):633-42.
344. Seiler N, Raul F. Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med*. 1 juill 2005;9(3):623-42.
345. Estrada G, Villegas E, Corzo G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat Prod Rep*. 31 janv 2007;24(1):145-61.
346. Ralton L, Bestwick CS, Thoo Lin PK. Polyamine Analogues and Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Curr Bioact Compd*. 1 sept 2007;3(3):179-91.
347. Senanayake MDT, Amunugama H, Boncher TD, Casero RA, Jr, Woster PM. Design of polyamine-based therapeutic agents: new targets and new directions. *Essays Biochem*. 46:77.
348. Vega ALD, Delcour AH. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol*. juill 1996;178(13):3715.
349. Kwon DH, Lu C-D. Polyamines Induce Resistance to Cationic Peptide, Aminoglycoside, and Quinolone Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*. mai 2006;50(5):1615.
350. Liu N, Benedik MJ, Delcour AH. Disruption of polyamine modulation by a single amino acid substitution on the L3 loop of the OmpC porin channel. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 12 juin 1997;1326(2):201-12.
351. Katsu T, Nakagawa H, Yasuda K. Interaction between Polyamines and Bacterial Outer Membranes as Investigated with Ion-Selective Electrodes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 avr 2002;46(4):1073-9.
352. Siala W, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, Hallin M, Denis O, Bambeke FV. Comparison of the Antibiotic Activities of Daptomycin, Vancomycin, and the Investigational Fluoroquinolone Delafloxacin against Biofilms from *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2014;58(11):6385.
353. Hobley L, Kim SH, Maezato Y, Wyllie S, Fairlamb AH, Stanley-Wall NR, et al. Norspermidine Is Not a Self-Produced Trigger for Biofilm Disassembly. *Cell*. 13 févr 2014;156(4):844-54.
354. Brunel JM, Lieutaud A, Lome V, Pagès J-M, Bolla J-M. Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria. *Bioorg Med Chem*. 1 mars 2013;21(5):1174-9.
355. Salmi C, Loncle C, Vidal N, Letourneux Y, Fantini J, Maresca M, et al. Squalamine: An Appropriate Strategy against the Emergence of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria? *PLoS ONE* [Internet]. 2008 [cité 14 nov 2016];3(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC2447875/>
356. Xu M, Davis RA, Feng Y, Sykes ML, Shelper T, Avery VM, et al. Ianthelliformisamines A-C, Antibacterial Bromotyrosine-Derived Metabolites from the Marine Sponge *Suberea ianthelliformis*. *J Nat Prod*. 25 mai 2012;75(5):1001-5.



357. Muth A, Pandey V, Kaur N, Wason M, Baker C, Han X, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Antimetastatic Agents Predicated upon Dihydromotuporamine C and Its Carbocyclic Derivatives. *J Med Chem*. 22 mai 2014;57(10):4023-34.
358. Berti L, Bolla JM, Brunel JM, Casanova J, Lorenzi V. Use of PolyaminoMisoprenyl in antibiotic or antiseptic treatment. EP11305193.2.
359. Mamelli L, Petit S, Chevalier J, Giglione C, Lieutaud A, Meinnel T, et al. New antibiotic molecules: bypassing the membrane barrier of gram negative bacteria increases the activity of peptide deformylase inhibitors. *PloS One*. 30 juill 2009;4(7):e6443.
360. Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. sept 1995;39(9):1948-53.
361. Jennings MC, Minbiole KPC, Wuest WM. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect Dis*. 10 juill 2015;1(7):288-303.
362. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 24 janv 2002;415(6870):389-95.
363. Djouhri-Bouktab L, Rolain JM, Brune JM. Mini-Review: Polyamines Metabolism, Toxicity and Potent Therapeutical Use. *Anti-Infective Agents*. 2013;(2211-3525/13).
364. Williams DE, Lassota P, Andersen RJ. Motuporamines A-C, Cytotoxic Alkaloids Isolated from the Marine Sponge *Xestospongia exigua* (Kirkpatrick). *J Org Chem*. 1 juill 1998;63(14):4838-41.
365. Roskelley CD, Williams DE, McHardy LM, Leong KG, Troussard A, Karsan A, et al. Inhibition of Tumor Cell Invasion and Angiogenesis by Motuporamines. *Cancer Res*. 15 sept 2001;61(18):6788-94.
366. Muth A, Madan M, Archer JJ, Ocampo N, Rodriguez L, Phanstiel O. Polyamine Transport Inhibitors: Design, Synthesis, and Combination Therapies with Difluoromethylornithine. *J Med Chem*. 23 janv 2014;57(2):348-63.
367. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol*. juin 2011;14(3):236-43.
368. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis*. févr 2013;13(2):155-65.
369. Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect*. août 2013;121(8):878-85.
370. European Medical Agency. Fifth ESVAC Report: Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013 [Internet]. 2015 oct. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/10/WC500195687.pdf)
371. Chauvin C, Beloeil P-A, Orand J-P, Sanders P, Madec F. A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France. *Prev Vet Med*. 30 sept 2002;55(2):109-20.
372. Prüller S, Rensch U, Meemken D, Kaspar H, Kopp PA, Klein G, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* Isolates from Swine and Companion Animals and Detection of Resistance Genes. *PLOS ONE*. août 2015;10(8):e0135703.
373. Briyne ND, Atkinson J, Borriello SP, Pokludová L. Antibiotics used most

- commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec.* 4 oct 2014;175(13):325-325.
374. Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.* sept 2014;22(9):536-45.
375. Bártíková H, Podlipná R, Skálová L. Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere.* févr 2016;144:2290-301.
376. Collignon PC, Conly JM, Andremont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, World Health Organization Advisory Group, Bogotá Meeting on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (WHO-AGISAR). World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 oct 2016;63(8):1087-93.
377. Kadlec K, Kehrenberg C, Wallmann J, Schwarz S. Antimicrobial Susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* Isolates from Porcine Respiratory Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 déc 2004;48(12):4903-6.
378. Borselli D, Lieutaud A, Theffenne H, Garnotel E, Pagès J-M, Brunel JM, et al. Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro. *PLOS ONE.* mai 2016;11(5):e0154490.
379. Bolla J, Brunel J, Casanova J, Lorenzi V, Berti L. Preparation of polyaminoisoprenyl derivatives for use in medical and nonmedical antibiotic or antiseptic treatment.
380. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* juill 2003;52(1):1.
381. Murray TS, Kazmierczak BI. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* oct 2006;188(19):6995-7004.
382. CORBIERES PRIOT L. SENSIBILITE DE BORDETELLA BRONCHISEPTICA AUX ANTIBIOTIQUES (ETUDE DE 80 SOUCHES) (DES BIOL. MED.) [Thèse d'exercice]. [France]; 1996.
383. Mamelli L, Demoulin E, Prouzet-Mauléon V, Mégraud F, Pagès J-M, Bolla J-M. Prevalence of efflux activity in low-level macrolide-resistant *Campylobacter* species. *J Antimicrob Chemother.* févr 2007;59(2):327-8.
384. Ghisalberti D, Masi M, Pagès J-M, Chevalier J. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun.* 25 mars 2005;328(4):1113-8.
385. Hay T, Fraud S, Lau CH-F, Gilmour C, Poole K. Antibiotic Inducibility of the mexXY Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the MexZ Anti-Repressor ArmZ. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cité 17 mars 2017];8(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pmc/articles/PMC3575510/>
386. Bohnert JA, Schuster S, Szymaniak-Vits M, Kern WV. Determination of Real-Time Efflux Phenotypes in *Escherichia coli* AcrB Binding Pocket Phenylalanine Mutants Using a 1,2'-Dinaphthylamine Efflux Assay. *PLOS ONE.* juin 2011;6(6):e21196.
387. Andrade BGN, Marin MFA, Cambuy DD, Fonseca EL, Souza NF, Vicente ACP. Complete genome sequence of a clinical *Bordetella pertussis* isolate from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* nov 2014;109(7):972-4.
388. White PA, Stokes HW, Bunny KL, Hall RM. Characterisation of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 1 juin 1999;175(1):27-35.
389. Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol.* janv

2011;9(1):62-75.

390. Hawkey PM. Pre-clinical experience with daptomycin. *J Antimicrob Chemother.* nov 2008;62 Suppl 3:iii7-14.

391. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell.* oct 2002;3(4):593-603.

392. Schobert M, Tielen P. Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* 30 mars 2010;5(4):603-21.

393. Boshoff HIM, Barry CE. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Microbiol.* janv 2005;3(1):70-80.

394. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2 nov 2011;9(12):894-6.

395. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Med Chem.* 2014;6:25-64.



## Identification and characterization of chemical/natural adjuvants to decrease the overuse of antibiotics in veterinary medicine

The constant increase of multidrug resistant bacteria and the lack novel antibiotic molecules are leaving clinicians and veterinarians with very limited options to treat bacterial infections, especially those caused by Gram-negative pathogens. Antibiotic resistance is a natural phenomenon of bacterial adaptation. However, misuse and abuse of ATBs over the last decades most likely explain the recent dramatic raise of multidrug resistance. Veterinary pharmaceutical companies, including Virbac, have chosen to decrease the use of new generations of antibiotics in order to reduce chances of selection and transfer of antibiotic resistance to humans.

In this context, the main goal of my work was find a chemical solution to reduce the use of antibiotics in veterinary medicine, especially in swines, without affecting the health of the livestock. To achieve this goal, we have developed a drug combination approach based on the association of antibiotics with chemosensitizers, herein called adjuvants, some of which were polyamines derivatives from natural sources.

To provide the proof of concept, combination of several derivatives from different chemical sources (ianthelliformisamines derivatives, polyamino-isoprenics derivatives, motuporamines derivatives) have been tested *ex vivo* on « ESKAPE » pathogens, which are among the most urgent bacterial threats. Results from these studies allowed us to develop procedures for screening antibacterial activities and methodologies for understanding the impact of the selected adjuvants on bacterial physiology. Altogether, our data provided clear evidence of the efficacy of drug combination therapy.

Florfenicol is a widely used antibiotic to treat infections caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. Therefore, polyamino-isoprenic derivatives were further assessed in combination with florfenicol by using our screening procedure, and florfenicol adjuvants were identified with potent activity on the sensitive reference strain as well as on swine isolates. The mode of action of one chosen adjuvant on bacterial membranes was further investigated by using fluorescence and bioluminescence methods. Data showed that this molecule was able to potentiate the antibiotic activity by increasing its intracellular concentration (membranotrope activity) but also causes inner membrane depolarization. The resulting inhibition of efflux pumps, which are normally energized by the PMF, produced a substantial increase in the intracellular concentration of antibiotic to inhibit the bacterial growth. Considering *B. bronchiseptica*, flagellar motility represents an important virulence factor as its helps colonization of the infected organs. Because the rotor flagellum is dependent on the PMF, we also tested the effect of the selected adjuvants on swimming and swarming motilities. The diminution of the motility's halo suggests that these molecules could be used as both ***anti-resistance*** and ***anti-virulence adjuvants***.

## Adjuvants pour limiter la consommation d'antibiotiques en médecine vétérinaire

L'émergence toujours plus importante de souches multirésistantes et le faible renouvellement de molécules d'antibiotiques conduisent la médecine humaine et vétérinaire à des impasses thérapeutiques certaines. La résistance bactérienne est un mécanisme naturel et inéluctable, néanmoins l'usage abusif et excessif des ATBs accélère et accentue fortement le processus d'antibiorésistance. L'industrie pharmaceutique vétérinaire, dont Virbac fait partie, est amenée à ne plus utiliser les molécules antibiotiques de dernières générations afin de diminuer les risques de sélection et de transfert de l'antibiorésistance chez l'homme.

Le but de cette étude était d'apporter une solution au problème de surconsommation d'ATBs en médecine vétérinaire et particulièrement dans les élevages de porcs. Pour cela nous avons développé une **approche de thérapie combinatoire** basé sur l'association d'ATBs déjà existants avec des molécules chimiosensibilisantes, appelées adjuvants. Nous avons ainsi évalué différents dérivés polyaminés d'origine naturelle.

Afin d'apporter la preuve de concept, *in vitro*, nous avons testé la combinaison de différents dérivés provenant d'origines différentes (dérivés iantheformisamines, dérivés polyamino-isopréniques, dérivés motuporamines) sur des pathogènes présentant une relevance clinique majeure en médecine humaine, les pathogènes dits « ESKAPE ». Ces différentes études ont permis de développer des protocoles de criblage, mais également des méthodes permettant d'élucider leur mode d'action à l'échelle de la cellule bactérienne.

Enfin, après avoir fourni une base de résultats solide démontrant l'efficacité *in vitro* d'une thérapie combinatoire, et, en particulier avec les dérivés polyamino-isopréniques, nous avons testé l'activité de ces composés en combinaison avec le florfenicol, ATB couramment utilisé pour traiter les infections respiratoires chez le porc. Après avoir identifié un composé adjuvant au florfenicol sur la souche de référence mais également sur différents isolats issus d'animaux, nous avons pu déterminer son mode d'action par différentes méthodes de fluorescence et de bioluminescence. Nous avons pu démontrer que le composé permet de synergiser l'activité de l'ATB par une action membranotrope, augmentant ainsi la concentration intracellulaire en ATB, mais également par une inhibition de la force motrice (FPM). L'inhibition de la FPM provoque l'inhibition des systèmes d'efflux ce qui contribue au maintien d'une concentration au-dessus du seuil d'efficacité à l'intérieur de la cellule permettant d'inhiber la croissance bactérienne. La motricité flagellaire des bactéries pathogènes est un élément important dans la colonisation des organes infectés. Le rotor flagellaire étant dépendant de la FPM, nous avons également évalué l'effet du composé sur la mobilité flagelle-dépendante de type « swimming » et « swarming ». La diminution de mobilité observée suggère que ces composés puissent être utilisés comme **inhibiteurs de la résistance** bactérienne, mais également comme **inhibiteurs de la virulence**.