THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté de Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale « Sciences Biologiques & Santé »
Secteur de Recherche : Pharmacologie et Science du médicament

Présentée par :
Grace Akrong

****

Analyses pharmacocinétique/pharmacodynamique *in vitro* et *in vivo* de l'impact de la taille de l'inoculum d'*Acinetobacter baumannii* vis-à-vis de la polymyxine B

****

Directrices de Thèse :

Pr Sandrine MARCHAND et Dr Alexia CHAUZY

****

Soutenue le 9 décembre 2021 devant la Commission d'Examen

JURY

Président	**Claire Dahyot-Fizelier**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	**David Boutoille**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Nantes
Rapporteur	**Aude Ferran**	Maître de conférence, École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Membre	**Catherine Llanes**	Maître de conférence, Université de Franche-Comté
Membre	**Sandrine Marchand**	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Membre	**Alexia Chauzy**	Maître de conférence, Université de Poitiers

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine Et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale « Sciences Biologiques & Sante »
Secteur De Recherche : Pharmacologie et Science du Médicament
Présentée par :

Grace AKRONG

****

Analyses pharmacocinétique/pharmacodynamique *in vitro* et *in vivo* de l'impact de la taille de l'inoculum d'*Acinetobacter baumannii* vis-à-vis de la polymyxine B

****

Directrices de Thèse :
Madame Sandrine MARCHAND
Madame Alexia CHAUZY
****

Soutenue le 9 décembre 2021

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Pr Claire Dahyot-Fizelier	Université de Poitiers	Président
Pr David Boutoille	Université de Nantes	Rapporteur
Dr Aude Ferran	École Nationale Vétérinaire de Toulouse	Rapporteur
Dr Catherine Llanes	Université de Franche-Comté	Examinateur
Pr Sandrine Marchand	Université de Poitiers	Directrice de thèse
Dr Alexia Chauzy	Université de Poitiers	Co-directrice de thèse

« *Pasaj la difisil. Mè pa ni dot manniè, fo koupé, enfounen, aksepté gwo difé.*
Gwo modan ni an tan, pouy ka chanjé la vi, pouy fini espwaté
Asou ban la vi a, fok alé pli douvan.
Tout' douvan ni an dèyè.
Soley toujou lévé »

Eugène Mona (Fas a Fas)

REMERCIEMENTS

Au Pr David Boutoille et Dr Aude Ferran, meerci pour l'honneur que vous m'accordez en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Au Pr Claire Dhayot-Fizelier et Dr Catherine Llanes, merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

A mes directrices de thèse, Pr Sandrine Marchand et Dr Alexia Chauzy.

Sandrine, merci de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir initiée à la pharmacocinétique. Merci pour tes conseils prodigués tout au long de cette thèse, ta rigueur et ta patience.

Alexia, merci d'avoir accepté de codiriger cette thèse. J'espère que cette première expérience restera un bon souvenir pour toi. Merci d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions concernant la modélisation. Merci pour ta rigueur, ta disponibilité et ta gentillesse.

Au Pr William Couet, merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Merci pour votre temps et vos conseils constructifs.

À Vincent et Mathilde, merci d'avoir contribué à ce travail grâce à vos talents de modélisateurs.

À Luc, merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions sur la biologie moléculaire (et l'informatique). Merci d'avoir accepté de réaliser le séquençage de mes souches.

A tous les membres du laboratoire U1070, merci pour votre aide et votre soutien. Merci pour tous ces bons moments passés à vos côtés.

Au Dr Julien Buyck, merci de m'avoir donné la chance de réaliser mon stage de M2 avec toi. Merci pour tes conseils en microbiologie. Merci d'avoir laissé libre cours à mon imagination pour t'épauler dans l'organisation de la Fête de la Science.

À Isabelle et Laure, merci pour votre précieuse aide pour les expérimentations animales et les bons moments passés ensemble à PREBIOS. Merci pour votre soutien et d'avoir sur me remotiver lorsque j'avais des coups de mou.

Au Dr Hélène Mirfenderski, et à Julian et Christophe, merci pour votre aide pour les dosages, vos conseils et vos oreilles attentives.

Aux Dr Frédéric Tewes, Dr Nicolas Gregoire, et Dr Kévin Brunet, merci pour vos conseils et discussions qui m'ont permis d'aborder mon travail de thèse sous différents angles de vue.

À Muriel et Agnès, merci d'avoir toujours été là pour m'écouter et me remonter le moral. J'ai été heureuse de vous rencontrer et je suis ravie de vous compter parmi mes amies. Ne changez surtout pas, le monde a besoin de plus de personnes aussi colorées que vous.

À Noémiz, Romain, Jeremy, Théo, Arthur, Emilie, Hanyssa, et Zahyra, merci pour votre bonne humeur sans faille. Merci pour ces discussions et moments de rires que je n'oublierai pas.

A mes compagnons de ~~galère~~ bureau Shachi, Hari, Rana, Margaux, et à la plus « mimi's » de tous, Clémence (Luc et Jennifer je ne vous oublie pas bien entendu). Merci d'avoir rendu ces 3 années plus douces avec votre bonne humeur et vos conseils. Merci pour ces moments de rires, de pause qui m'ont permis de souffler quand j'en avais le plus besoin.

Une mention spéciale à mon binôme de choc, Biquette des neiges (j'ai tenu ma promesse !), le Dr Tardiveau to be. Merci pour tous nos moments de fous rire, ton soutien et tes conseils. Du début jusqu'à la fin tu as été là pour moi dans les bons comme les mauvais moments. À cause, ou devrais-je dire, grâce à toi j'ai mis un pied dans le monde fascinant de la communication scientifique avec l'aventure Pint of Science. Je te souhaite de réussir et de t'épanouir à Nice.

Bien entendu, à mes proches sans qui je ne serai pas là. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi.

À mes parents, merci de m'avoir accompagnée et épaulée jusqu'ici.

À Valérie (Sarah de son vrai nom), Éric, Brunette, Marie-Félix, et Jimmy merci de m'avoir soutenue.

A Lysa, Céline, Aminatha, Gilvaine, Jikate, Aurore, Adji et Adriana, merci pour votre amitié.

A, Adélie, Nadia et Manon, merci pour votre amitié et votre soutien. Merci de m'avoir conseillée pour la thèse et l'après-thèse ; grâce à vous j'aborde plus sereinement ma vie post-doctorale.

Enfin, à mon *Chien abiyé en moun* préféré, merci pour ton soutien quotidien sans faille, même quand tu étais fatigué et que tu ne comprenais rien à ce que je te racontais. Merci de m'avoir rassurée dans les moments de doute et de m'avoir faire rire quand la thèse me faisait flancher. Juste qu'au point final tu auras été mon meilleur partenaire.

Pour tout cela, même si cela n'a pas été toujours évident, je vous remercie tous du fond du cœur pour cette aventure exceptionnelle.

A toi, « Papi » Max qui est parti trop tôt.
Maintenant, saches que je peux faire 8 lessives à la fois.
Ton humeur, ton rire et ton sourire me manqueront à jamais.
PS : J'espère que les « Bech ma gueule » ont meilleur goût là où tu es.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES COMMUNICATIONS 8

LISTE DES ABREVIATIONS 9

LISTE DES TABLEAUX 13

LISTE DES FIGURES 14

INTRODUCTION 17

REVUE DE LA LITTERATURE 23

CHAPITRE 1 : *ACINETOBACTER BAUMANNII*, UN PATHOGENE QUI POSE PROBLEMES 24

I. *Acinetobacter baumannii*, un pathogène opportuniste 25

II. Structure membranaire et facteurs de virulence d'*A. baumannii* 27

A. Structure membranaire d'*A. baumannii* 27

B. La corne d'abondance des facteurs de virulence d'*A. baumannii* 28

1. Les outer membrane proteins (OMPs) 31

2. Les exopolysaccharides de surface 32

a. Le lipooligosaccharide (LOS) 32

b. Les exopolysaccharides capsulaires (PSC) 34

3. Le *quorum sensing,* un mode de communication entre les bactéries 36

4. La formation de biofilms adhérents biotiques et abiotiques 38

III. Résistances aux antibiotiques 39

Mécanismes de résistances aux ß-lactamines 44

1. Les porines 44

2. Les pompes d'efflux 46

3. Les ß-lactamases 48

a. Les céphalosporinases 48

b. Les ß-lactamases à spectre étendu (BLSE) 49

c. Les oxacillinases 49

d. Les Métallo-ß-lactamases (MBL) 50

IV. Traitements des infections à *A. baumannii* 50

CHAPITRE 2 : LA POLYMYXINE B, UN TRAITEMENT DE DERNIER RECOURS 54

I. Structure chimique 54

II. Mode d'action de la polymyxine B 56

III. Utilisations en clinique 58

A. Préparation et administration de la polymyxine B 58

B. PK/PD de la polymyxine B 58

1. Pharmacocinétique de la polymyxine B 58

2. Pharmacodynamie de la polymyxine B 60

3. Indications de la polymyxine B 61

IV. Mécanismes de résistance aux polymyxines B chez *A. baumannii* 62

A. Modification du lipide A du lipooligosaccharide 62

1. Ajout d'un groupement PEtN médié par le système PmrA-PmrB 62

2. Ajout d'un groupement PEtN médié par une protéine homologue de PmrC, EptA 65

B. Perte du lipooligosaccharide 66

CHAPITRE 3 : DE MULTIPLES METHODES D'EVALUATION DE L'EFFICACITE DES ANTIBIOTIQUES 68

I. Méthodes d'étude *in vitro* 69

A. La mesure de concentration minimale inhibitrice (CMI) 69

B. Les courbes de bactéricidie ou *time-kill curves* (TKC) 73

1. Time-kill curves statiques 73

2. Time-kill curves dynamiques 75

a. Systèmes dynamiques basés sur la dilution 75

b. Systèmes dynamiques basés sur la diffusion ou la dialyse 76

II. Méthodes d'étude *in vivo* 80

A. Modèles animaux infectieux alternatifs à *A. baumannii* 80

B. Modèles animaux mammaliens à *A. baumannii* 81

1. Modèle murin neutropénique d'infection de la cuisse à *A. baumannii* 83

2. Modèles murins neutropéniques d'infection pulmonaire à *A. baumannii* 85

3. Modèle murin d'infection de la cuisse vs. Modèle murin d'infection pulmonaire à *A. baumannii* 87

III. Une standardisation des protocoles, une nécessité pour la lutte contre l'antibiorésistance 89

CHAPITRE 4 : L'EFFET INOCULUM, UN PHENOMENE IMPACTANT L'EFFICACITE DES ANTIBIOTIQUES 91

I. Définition de l'effet inoculum 91

II. Méthodes d'étude de l'effet inoculum 92

A. Mesure de la CMI 92

1. Étude descriptive de la variation de la CMI en fonction de la taille de l'inoculum 92
2. Caractérisation de la relation entre la CMI et la taille de l'inoculum par des approches mathématiques 93
B. Time-kill curves statiques 97
1. Étude descriptive de la variation de l'effet des antibiotiques au cours du temps en fonction de la taille de l'inoculum 97
2. Caractérisation de la relation entre l'efficacité des antibiotiques *in vitro* et la taille de l'inoculum par des approches mathématiques 98
C. Les *hollow*-fibers 100
D. Modèles expérimentaux animaux 102

III. L'EI, un phénomène dont les origines sont multiples 104
A. Un déséquilibre entre le nombre de molécules d'antibiotique et nombre de bactéries 104
B. La production de ß-lactamases 104
C. Une fixation aux cibles présentes dans le milieu extracellulaire 105
D. Une population bactérienne hétérorésistante 106
E. La production de biofilms bactériens 107
F. La modification de l'expression des cibles des antibiotiques 107
G. Un changement d'état physiologique 108
H. Le *quorum sensing* 108

OBJECTIFS 110

TRAVAIL EXPERIMENTAL 113

AXE 1 : ÉVALUATION DE L'IMPACT DE LA TAILLE DE L'INOCULUM D'*A. BAUMANNII* SUR L'ACTIVITE DE LA POLYMYXINE B *IN VITRO* 114

AXE 2 : COMPARAISON DES RESULTATS *IN VITRO* AUX RESULTATS *IN VIVO* OBTENUS DANS UN MODELE MURIN D'INFECTION DE LA CUISSE ET D'INFECTION PULMONAIRE A *A. BAUMANNII* 145

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 173

ANNEXES 181

REFERENCES 183

Liste des communications

Articles

1. **Grace Akrong***, Alexia Chauzy*, Vincent Aranzana-Climent, Mathilde Lacroix, Laure Prouvensier, Julien. M Buyck, William Couet, Sandrine Marchand (*Co-premiers auteurs). A new PKPD model to characterize the inoculum effect of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B *in vitro*. **Soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal* (Référence: AAC01789-21)**
2. *In vivo* PK/PD analysis of the impact of the inoculum size of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B. **En écriture – Dans le manuscrit**

Posters

1. **Grace Akrong**, Alexia Chauzy, Mathilde Lacroix, Hamasseh Shirvani, Laure Prouvensier, Julien Buyck, William Couet et Sandrine Marchand. *In vitro* PK/PD analysis of the impact of the size of the inoculum of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B. World Microbe Forum, Online Worldwide, Juin 2021.
2. **Grace Akrong**, Alexia Chauzy, Isabelle Lamarche, Hélène Mirfendereski, Julien Buyck, William Couet et Sandrine Marchand. *In vivo* PK/PD analysis of the impact of the size of the inoculum of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online Worldwide, Juin 2021.
3. **Grace Akrong**, Alexia Chauzy, Mathilde Lacroix, Hamasseh Shirvani, Laure Prouvensier, Julien Buyck, William Couet et Sandrine Marchand. *In vitro* PK/PD analysis of the impact of the size of the inoculum of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online Worldwide, Juillet 2021.
4. **Grace Akrong**, Alexia Chauzy, Isabelle Lamarche, Hélène Mirfendereski, Julien Buyck, William Couet et Sandrine Marchand. *In vivo* PK/PD analysis of the impact of the size of the inoculum of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Online Worldwide, Juillet 2021.

Liste des abréviations

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*

A. calcaoeticus: *Acinetobacter calcaoeticus*

A. johnsonii : *Acinetobacter johnsonii*

A. lwoffii : *Acinetobacter lwoffii*

A. nosocomialis : *Acinetobacter nosocomialis*

A. pittii : *Acinetobacter pittii*

A. radioresistens : *Acinetobacter radioresistens*

ABC: *ATB binding cassette*

ADCs:*Acinetobacter-derived cephalosporinases*

AHLs : *N*-acyl-homosérine lactones

AIM : *Australian imipenemase*

ANR : Agence Nationale de la Recherche

AUC : aire sous la courbe

BGN : bactérie à Gram négatif

BGP : bactérie à Gram positif

BLSE : ß-lactamases à spectre étendu

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

CarO : *carbapenem-associated OMP*

Cl_{cr} : Clairance de la créatinine

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

C_{max} : Concentration maximalz

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMS : colistine méthanesulfonate

CPM : concentration prévenant les mutants

CRAB : Carbapenem-resistant *A. baumannii*

CST : colistine

CTX-M : *Cefotaxime-Mucnich*

D-Phe : D-Phénylalanine

D. rerio : *Danio rerio*

ECDC : *European Centre for Disease Prevention and Control*

EFPIA : Fédération européenne des associations et industries pharmaceutiques

EI : Effet inoculum

ESKAPE : *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter* spp.

FSM : Fenêtre de sélection des mutants

G. mellonella : *Galleria mellonella*

GIM : *German imipenemase*

Gtr : glycosyltransférase

IMI : Initiatives pour les Médicaments Innovants

IMP : imipénèmase

INSERM : Institut National de la Sante et de la Recherche Médicale

IS : Séquence d'insertion

Itr : transférase initiatrice

JPIAMR : « *Joint Programming Initiative on AntiMicrobial Resistance* »

KHM : *Kyorin Unniversity Hospial imipenemase*

L-Dab : Acide L-α,γ-diaminobutyrique

L-Leu : L-leucine

LOQ : limite de quantification

LOS : lipooligosaccharide

LPS : lipopolysaccharide

M. calcoaceticus: *Micrococcus calcoaceticus*

MATE : *multidrug and toxic compound extrusion*

MBL : métallo-ß-lactamase

MBL : métallo-ß-lactamases

MFS : *major facilitator superfamily*

NDM : *New Delhi metallo-ß-lactamase*

OMPs : *outer membrane proteins*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMVs : *outer membrane vesicules*

OXA : oxacillinase

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PAVM : pneumonie acquise sous ventilation mécanique

PD : pharmacodynamique

PER : *Poirel Esthel Ronco*

PEtN : phospho-éthanolamine

PK : pharmacocinétique

PLP : protéine liant les pénicillines

PMB : polymyxine B

PNAG : poly-ß-1-6-*N*-acetylglucosamine

PPR : Programme Prioritaire de Recherche

PSC : polysaccharide capsulaire

RND : *drug/metabolite transporter*

RND *: resistance-nodulation-division*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

SHV : *Sulfhydral variable*

SIM : *Seoul imipenemase*

SMR : *small multidrug resistance*

SPM *: São Paulo metallo-ß-lactamase*

$T_{>CMI}$: temps au-dessus de la CMI

TEM : *Temoneria*

TKC : *Time-kill curves*

TLRs : *Toll-Like Receptors*

Und-P : Udécaprényl-pyrophosphate

VEB : *Vietnam extended-spectrum ß-lactamase*

VIM : *Verona intregon-encoded metallo-ß-lactamase*

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste de l'OMS des bactéries prioritaires pour la recherche et le développement de nouvelles solutions thérapeutiques 20
Tableau 2. Facteurs de risques associés aux infections nosocomiales à *A. baumannii* – Adapté de (Fournier, Richet, et Weinstein 2006; Playford, Craig, et Iredell 2007; Villegas et Hartstein 2003; Garnacho-Montero et Timsit 2019) 26
Tableau 3. Facteurs de virulence d'*A. baumannii* – Adapté de (Morris et al. 2019; Tipton et al. 2018; Jun et al. 2013; Agarwal et al. 2019) 29
Tableau 4. Mécanismes de résistances aux antibiotiques d'*A. baumannii* – Adapté de (Garnacho-Montero et Timsit 2019; Peleg, Seifert, et Paterson 2008; Geisinger et Isberg 2015) 42
Tableau 5. Pompes d'efflux ayant été décrites chez *A. baumannii* – Adapaté (Jordi Vila, Martí, et Sánchez-Céspedes 2007; Okada et al. 2017) 48
Tableau 6. Composition chimique de la polymyxine B et de la colistine 55

Liste des figures

Figure 1. Consommation mondiale des antibiotiques en 2019 – D'après les données du *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) 18
Figure 2. Schéma de la structure de la membrane d'*A. baumannii* – Adapté de Dahl 2008; Singh, Adams, and Brown 2019) – LOS : lipooligosaccharide ; OMP : *Outer membrane protein* ; PSC : polysaccharides capsulaires ; PNAG : poly-ß-1-6-*N*-acetylglucosamine – Créé avec Servier Medical Art 28
Figure 3. Schéma de la voie de biosynthèse du lipooligasaccharide (LOS) – Adapté de Powers and Trent 2018, Créé avec Servier Medical Art 33
Figure 4. Schéma de la voie de biosynthèse des polysaccharides capsulaire (PSC) – Adapté de Singh, Adams, and Brown 2019, Créé avec Servier Medical Art 35
Figure 5. Schéma du mécanisme du *quorum sensing* chez *A. baumannii* – Créé avec bioRender.com 37
Figure 6. Formation d'un biofilm bactérien (Adapté de ("Biofilms bactériens et santé" 2020) 39
Figure 7. Pourcentage d'isolats d'*Acinetobacter* spp. résistants aux fluoroquinolones, aminosides et carbapénèmes) dans les pays européens en 2012 (à gauche) et en 2019 (à droite) – Adapté des données de l'ECDC 40
Figure 8. Pourcentage d'isolats d'*Acinetobacter* spp. résistants aux carbapénèmes dans les pays européens en 2012 (à gauche) et en 2019 (à droite) – Adapté des données de l'ECDC. 41
Figure 9. Schéma des mécanismes de résistance aux antibiotiques grâce aux porines – Adapté de (Pagès, James, et Winterhalter 2008), Créé avec Servier Medical Art 45
Figure 10. Schéma des différentes familles de pompes d'efflux – Adapté de (Blanco et al. 2016), Créé avec Servier Medical Art 47
Figure 11. Arbre de décision de la démarche thérapeutique face aux infections dues à *A. baumannii* 51
Figure 12. Structure des polymyxines classe des polypeptides 54
Figure 13. Structures chimiques des polymyxines B1 (*en haut*) et B2 (*en bas)* 56
Figure 14. Mode d'action de la polymyxine B sur les bactéries à Gram négatif – Adapté (Deris et al. 2014; Sabnis et al. 2021), Créé avec Servier Medeical Art 57

Figure 15. Schéma de la pharmacocinétique de la PMB (en haut) et du CMS (en bas) *in vivo* après administration par voie intraveineuse. Les rectangles grisés représentent les compartiments *in vivo*. Les flèches blanches représentent les étapes majoritaires. Les flèches noires en pointillés représentent les étapes minoritaires – Traduit de (Cai, Lee, and Kwa 2015) 60
Figure 16. Modification de lipide A du LOS en réponse à une faible concentration de Mg^{2+} - Créé avec Servier Medical Art 63
Figure 17. Modification du lipide A en réponse aux polymyxines à la suite de mutations du gène *PmrB* – Créé avec Servier Medical Art 64
Figure 18. Modification du lipide A en réponse aux polymyxines à la suite de mutations du gène *PmrA* – Créé avec Servier Medical Art 65
Figure 19. Modification du lipide A à la suite de l'insertion de la séquence *ISAba*I en amont du gène *eptA* – Créé avec Servier Medical Art 66
Figure 20. Perte du LOS à la suite mutation dans les gènes *lpxA*, *lpxC* et/ou *lpxD* – Créé avec Servier Medical Art 67
Figure 21. Schéma représentant la pharmacocinétique (PK), la pharmacodynamie (PD) et la pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) – D'après (Derendorf and Meibohm 1999), Créé avec bioRender.com 68
Figure 22. Pourcentages des résultats pour chaque méthode sur PubMed 69
Figure 23. Schéma de la lecture d'un antibiogramme – Crée avec bioRender.com 70
Figure 24. Mesure de la CMI par méthode diffusion en gélose (E-test) 71
Figure 25. Mesure de la CMI par méthode de dilutions sériées. Les tubes dans lesquels une turbidité est observée (+), correspondent à une croissance bactérienne visible à l'œil nu. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle aucune turbidité (-) n'est observée après 18h d'incubation à 35°C. – Créé avec Servier Medical Art 72
Figure 26. Schéma des profils typiques des courbes de bactéricidie – Créé avec bioRender.com 75
Figure 27. Schéma d'un système dynamique basé sur la dilution - D'après (Rose 2016) 76
Figure 28. Schéma d'un système dynamique "*hollow-fibers*" basé sur la dialyse – D'après (Drusano et al. 2011) 77
Figure 29. Schéma du montage expérimental de Srivastava *et al.* 2016 78

Figure 30. Schéma d'une coupe transversale d'une cartouche d'*hollow-fibers* - D'après (Rose 2016)..... 79
Figure 31. Schéma des index PK/PD - Créé avec Biorender.com..... 82
Figure 32. Schéma des paramètres fondamentaux pour la définition d'un effet inoculum à partir de la CMI – Traduit de (Li and Ma 1998)..... 94
Figure 33. Augmentation de la CMI des différents antibiotiques testés en fonction de la taille de l'inoculum d'*E. coli* (symboles blancs) et *S. aureus* (symboles noirs). Les lignes pleines représentent les simulations du modèle pour *E. coli*, et les lignes en pointillées celle obtenues pour *S. aureus* – Traduit de R. C. Li and Ma 1998)..... 95
Figure 34. Exemple de prédictions des modèles mathématiques obtenues pour la caractérisation de la relation entre la CMI de la gentamicine (log_2 (CMI)) et la densité bactérienne (log_{10} (UFC/mL)) *de S. aureus*. Les données expérimentales des CMI sont représentées par des cercles noirs et les prédictions par des lignes de couleur. Le modèle ayant prédit le mieux les données expérimentales est représenté par une ligne pleine ; les prédictions des autres modèles sont représentées par ordre décroissant par des lignes en pointillés. La croix montre la densité bactérienne seuil correspondant au point d'inflexion de la courbe d'augmentation de la CMI prédite par les 3 meilleurs modèles. – D'après (Salas et al. 2020)..... 96
Figure 35. Schéma du modèle PKPD utilisé par Nielsen *et al.* pour la caractérisation de l'EI d'*E. coli* sur l'activité *in vitro* de la ciprofloxacine. – D'après (E. I. Nielsen et al. 2017)..... 99
Figure 36. Schéma du modèle PKPD utilisé par Bulitta *et al.* pour la caractérisation de l'EI de *P. aeruginosa* sur l'activité *in vitro* de la ceftazidime – D'après (Bulitta et al. 2009)..... 100
Figure 37. Schéma de la fenêtre de sélection des mutants – D'après (Cantón and Morosini 2011), Créé avec Biorender.com..... 106
Figure 38. Schéma de la démarche scientifique de la thèse..... 111
Figure 39. Schéma du modèle PKPD avec deux types d'effet inoclum (IE1 et EI2). Dérivé de (Chauzy et al. 2019)..... 176
Figure 40. Simulations à partir du modèle in vitro (article soumis : AAC01789-21) du nombre de bactéries (CFU/cuisse) en fonction du temps après une dose unique de PMB (1, 15 et 40 mg/kg) pour des inocula initiaux de 10^6 et 10^7 CFU/cuisse. Les cercles pleins représentent les données expérimentales et les traits pleins, les prédictions du modèle..... 179

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques durant le 20e siècle est l'un des plus grands succès de la médecine (Wright 2007). En 2019, près de 45 doses journalières définies d'antibiotiques pour 1000 habitants ont été utilisées en France (usages communautaire et hospitalier confondus) Figure 1 (« Geographical Distribution of Antimicrobial Consumption » s. d.).

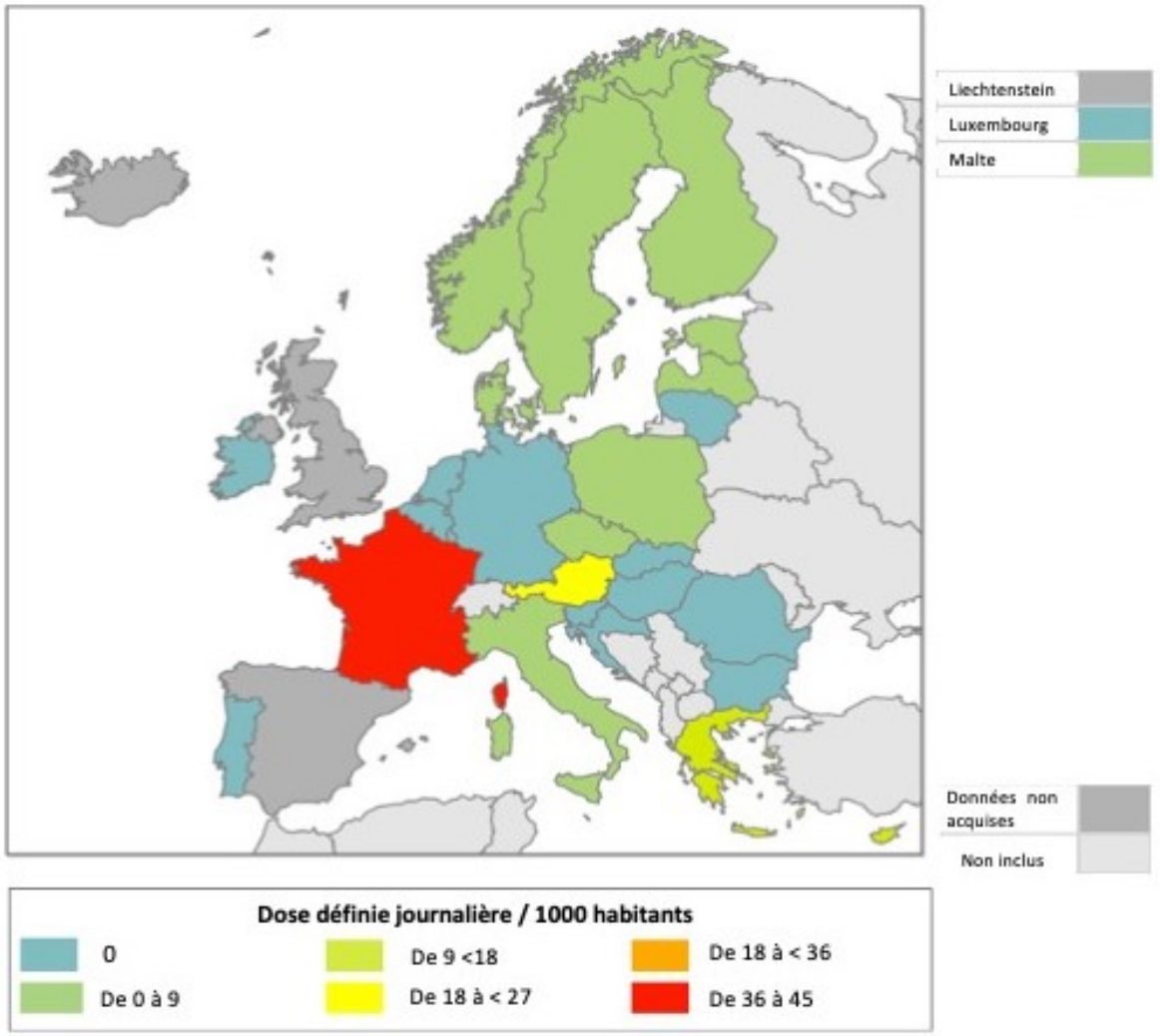


Figure 1. Consommation mondiale des antibiotiques en 2019 – D'après les données du *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC)

L'utilisation intensive des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, mais aussi en agriculture animale, ainsi que leur mauvais usage ont conduit à l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotique (Wright 2007). Ainsi, à la fin du 20e siècle, des bactéries résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques (ou bactéries multirésistantes) se sont développées. Or, on estime que si rien n'est fait pour trouver de solutions face à ces bactéries multirésistantes, d'ici 2050, le taux de mortalité due à l'antibiorésistance pourrait atteindre

10 millions de morts et ainsi dépasser le taux de mortalité estimé pour le cancer (Dadgostar 2019).

C'est pour cela que l'Organisme Mondial de la Santé (OMS) a publié en 2017 une liste de 12 bactéries classées en trois catégories constituent actuellement un danger pour la santé humaine, étant donné leur degré de résistances aux antibiotiques et donc l'urgence de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour ces agents pathogènes (Tableau 1) (« L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques » 2018). Parmis ces 12 agents pathogènes, on retrouve les 6 bactéries du groupe « ESKAPE », à savoir : *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter* spp. Ce groupe de 6 bactéries sont nommées ainsi ainsi en reaison de leur capacité à « échapper » à l'action des antibiotiques. Elles représentent le plus haut risque de mortalité en lien avec leur forte virulence et de leur multirésistance, mais aussi un coût important dû par aux soins des infections qu'elles provoquent en clinique (Founou, Founou, et Essack 2017).

La catégorie « Priorité 1 : Critique » regroupe les bactéries représenant une priorité critique. Ces bactéries sont toutes résistantes soit aux carbapénèmes, soit aux céphalosporines de 3e génération, des antibiotiques qui étaient jusque là réservés au traitement des infections liées aux soins (aussi appelées infections nosocomiales), telles que des bactériémies et des pneumonies, causées par des bactéries multirésistantes avec un fort taux de mortalité. Ces bactéries représentent un danger pour les patients hospitalisés, placés en maisons de retraite ou encore chez les patients dont les soins nécessitent une ventilation mécanique ou encore la pose de cathéters sanguins. Parmi les trois types de bactéries de cette classe, on retrouve les souches d'Acinetobacter *baumannii* (*A. baumannii*) résistantes aux carbapénèmes.

Les bactéries classées dans les catégories « Priorité 3 : Moyenne » et « Priorité 2 : Élevée » comprennent des bactéries de plus en plus résistantes, à l'origine de maladies courantes telles que la gonorrhée et les infections alimentaires par les salmonelles.

Tableau 1. Liste de l'OMS des bactéries prioritaires pour la recherche et le développement de nouvelles solutions thérapeutiques

Classe 1 : Critique
• *Acinetobacter baumannii**, résistant aux carbapénèmes (CRAB pour *carbapenem resistant A. baumannii)* • *Pseudomonas aeruginosa**, résistant aux carbapénèmes • Entérobactéries* dont *K. pneumoniae**, résistantes aux carbapénèmes et produisant des ß-lactamases à spectre large (BLSE)
Classe 2 : Élevée
• *Enterococcus faecium**, résistant à la vancomycine • *Staphylococcus aureus**, résistant à la méthicylline et à la vancomycine • *Helicobacter pylori*, résistant à la clarithromycine • *Campylobacter* ssp., résistant aux fluoroquinolones • *Salmonellae*, résistant aux fluoroquinolones • *Neisseria gonorrhoeae*, résistant aux céphalosporines et aux fluoroquinolones
Classe 3 : Moyenne
• *Streptococcus pneumoniae*, insensible à la pénicilline • *Haemophilus influenzae*, résistant à l'ampicilline • *Shigella* spp., résistant aux fluoroquinolones

** : bactéries ESKAPE*

A travers cette liste, l'OMS encourage la recherche et le développement de nouvelles solutions thérapeutiques pour faire face aux infections liées aux soins causées par ces bactéries. Ainsi, les gouvernements sont incités à mettre en œuvre des dispositifs pour que les agences, financées par les secteurs public et privé, s'investissent davantage dans la recherche fondamentale, mais aussi dans la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les projets « Initiative pour les médicaments innovants » (IMI) (« About IMI » s. d.). Ces projets sont des partenariats public-privé entre l'Union européenne et la fédération européenne des associations et industries pharmaceutiques (EFPIA) dont l'objectif est de développer de nouveaux traitements, comme les antibiotiques. Du côté de la recherche fondamentale, des études sont menées dans le but d'optimiser l'utilisation des antibiotiques déjà existants. C'est dans ce but que la plateforme de collaboration internationale « *Joint Programming Initiative on AntiMicrobial Resistance* »

(JPIAMR), dont 28 pays comme la France, l'Argentine, le Canada, l'Inde ou en l'Afrique du Sud sont membres, a été créée. En effet, elle a pour missions de coordonner le financement de la recherche et de soutenir les actions de collaboration visant à participer à la lutte contre l'antibiorésistance (« About | JPIAMR » s. d.). Les agences publiques nationales, telles que l'Institut National de la Sante et de la Recherche Médicale (INSERM), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) ou encore la Région Nouvelle-Aquitaine participent aussi à cette lutte grâce au financement de projets de recherche tels que le Programme Prioritaire de Recherche (PRR) Antibiorésistance (« Programme Prioritaire de Recherche (PPR) Antibiorésistance - I3M / front-office » s. d.).

REVUE DE LA LITTERATURE

Chapitre 1 : *Acinetobacter baumannii*, un pathogène qui pose problèmes

La première bactérie du genre *Acinetobacter* a été isolée en 1911 par le microbiologiste allemand Beijerinck qui l'a nommée *Micrococcus calcoaceticus* (Peleg, Seifert, et Paterson 2008; Howard et al. 2012). Durant les décennies suivant cette découverte, des bactéries similaires à *M. calcoaceticus* ont été décrites et assignées à 15 genres et espèces différents, comprenant les espèces anciennement nommées *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffi*, *Herellea vaginicola, Bacterium anitratum*, *Neisseria winogradskyi*, *Achromobacter anitratus et Achromobacter mucosus* (Peleg, Seifert, et Paterson 2008; Antunes, Visca, et Towner 2014). En 1954, la désignation actuelle du genre, *Acinetobacter* (du grec [akinetos] qui signifie immobile), a été proposée pour la première fois afin de séparer les espèces des bactéries non mobiles des bactéries mobiles appartenant au genre de l'époque des *Achromobacter* (Peleg, Seifert, et Paterson 2008; Antunes, Visca, et Towner 2014; Howard et al. 2012). Elle ne fut acceptée qu'en 1968 grâce aux travaux du Professeur Baumann qui a démontré que toutes les bactéries précédemment citées appartenaient toutes au même genre : le genre *Acinetobacter* (Baumann 1968; Howard et al. 2012; Peleg et al. 2012).

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont des bactéries Gram négatif (BGN) ubiquitaires de l'environnement. L'espèce *Acinetobacter baumannii (A. baumannii),* bien que n'étant pas une bactérie typique de l'environnement, a été aussi isolée dans le sol à Hong-Kong et sur des végétaux au Royaume-Uni. Ce pathogène doit d'ailleurs son nom au Professeur Paul Baumann qui fut le premier microbiologiste à l'avoir isolée à partir d'un prélèvement du sol en 1968. Par ailleurs, certaines espèces comme *Acinetobacter johnsonnii*, *Acinetobacter lwoffii* et *Acinetobacter radioresistens* peuvent être retrouvées également dans la flore cutanée, intestinale et fécale humaine. Toutefois, seules les bactéries appartenant au complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex* (*Acinetobacter baumannii*, *Acinectobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii, Acinetobacter seifertii* sp. nov. et *Acinetobacter lactucae*) sont **à l'origine de pathologies humaines** (Villalón et al. 2019) dont *A. baumannii, qui* est **la bactérie la plus virulente** (Chusri et al. 2014; Peleg et al. 2012).

Ainsi dans les années 60-70, des infections causées par ces bactéries ont émergé. Elles étaient à l'origine de septicémies, endocardites, méningites, infections pulmonaires et d'infections urinaires (Daly, Postic, et Kass 1962; Glew, Moellering, et Kunz 1977).

I. *Acinetobacter baumannii*, un pathogène opportuniste

La bactérie *A. baumannii* est qualifiée de pathogène opportuniste, car elle engendre des infections uniquement dans certaines conditions. En effet, elle peut être responsable de pneumonies communautaires notamment dans les régions tropicales avec un taux de mortalité compris entre 20 à 40 % selon les régions (D. J. Barnes, Naraqi, et Igo 1988; Nicholas M. Anstey et al. 2002; Chen et al. 2001; N. M. Anstey, Currie, et Withnall 1992). Elles sont souvent associées à des comorbidités comme le diabète, le cancer, les maladies rénales ou des bronchopneumopathies chroniques obstructives (Leung et al. 2006; J.-T. Wang et al. 2002; Chen et al. 2001; N. M. Anstey, Currie, et Withnall 1992).

A. baumannii a été identifiée comme étant à l'origine d'infections (infections pulmonaires, cutanées, urinaires et bactériémies) survenues lors de catastrophes naturelles comme en 2008 après le tremblement de terre survenu en Chine et en 2004 après le tsunami en Indonésie ou de guerres comme en Afghanistan ou en Iraq (Y. Wang et al. 2010; B. Zhang et al. 2012; Fily et al. 2019; Maegele et al. 2005; Öncül et al. 2002).

Toutefois, *A. baumannii* est retrouvée dans diverses infections associées aux soins (aussi appelées infections nosocomiales) telles que les méningites, les péritonites, les infections du tractus urinaire ou encore des infections cutanées. **Les infections associées aux soins les plus fréquentes dues à *A. baumannii* sont les bactériémies et les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM)** (pneumonie survenant 48 à 72 heures après d'intubation (Koenig et Truwit 2006)) chez des patients hospitalisés dans les services de soins intensifs (Wong et al. 2017). Les PAVM à *A. baumannii*, sont souvent des **PAVM tardives** (c'est-à-dire 4 jours après intubation) et peuvent être causées par l'utilisation de sondes trachéales contaminées ou de systèmes de ventilation contaminés par *A. baumannii* (Betrosian et al. 2007; Karakuzu et al. 2018; El-Saed et al. 2013). *A. baumannii* présente la capacité à former des **biofilms adhérents** lui permettant ainsi de coloniser des sondes d'intubation. Ainsi, lors de la respiration, les gouttelettes chargées en *A. baumannii* peuvent atteindre directement

les alvéoles pulmonaires et la bactérie peut y établir une infection pulmonaire (Gil-Perotin et al. 2012). Le **taux de mortalité** des PAVM à *A. baumannii* est compris en **25 à 75% selon les régions** (Fagon et al. 1996; Garnacho et al. 2003; Penwell et al. 2015). Les **nombreux facteurs de risques**, tels qu'une immunosuppression, une défaillance respiratoire ou une antibiothérapie antérieure, associés au développement des infections associées aux soins dues à *A. baumannii* sont répertoriés dans le Tableau 2 (Fournier, Richet, et Weinstein 2006; Playford, Craig, et Iredell 2007; Villegas et Hartstein 2003; Garnacho-Montero et Timsit 2019).

Tableau 2. Facteurs de risques associés aux infections nosocomiales à *A. baumannii* – Adapté de (Fournier, Richet, et Weinstein 2006; Playford, Craig, et Iredell 2007; Villegas et Hartstein 2003; Garnacho-Montero et Timsit 2019)

- Colonisations antérieures par *A. baumannii*
- Gravité de la maladie sous-jacente
- Immunosuppression
- Malignités
- Maladies pulmonaires chroniques
- Antibiothérapie antérieure, notamment avec des carbapénèmes ou des céphalosporines de 3e génération
- Admission avec une défaillance pulmonaire
- Septicémies dans le service des soins intensifs
- Multiples procédures invasives (présence d'un cathéter (voie centrale, cathéter urinaire), d'une sonde naso-gastrique, d'une ventilation mécanique)
- Âge avancé
- Long séjour en soins intensifs

II. Structure membranaire et facteurs de virulence d'*A. baumannii*

Afin de mieux comprendre le mode d'action des antibiotiques, les mécanismes de résistance aux antibiotiques et l'importance des facteurs de virulence d'*A. baumannii* pour sa survie en milieu hospitalier et dans l'organisme de son hôte, il est important de faire un rappel de sa structure membranaire.

A. Structure membranaire d'*A. baumannii*

Les BGN possèdent une **double membrane lipidique** (une membrane interne et une membrane externe) séparée par un espace inter-membranaire, appelé périplasme, riche en peptidoglycane, un polymère complexe organisé en une ou deux couches (selon les espèces) comme illustré dans la Figure 2.

Au sein de la membrane externe se trouvent des protéines membranaires monomériques ou trimériques appelées les ***outer membrane proteins*** **(OMPs)**. Les OMPs permettent de consolider la structure de la membrane externe, mais ont aussi une importance pour la physiologie de la bactérie. Certaines d'entre elles, appelées des porines, permettent l'influx de solutés hydrophiles à travers la membrane externe des BGN (Figure 2). Les OMPs constituent l'un des facteurs de virulence et de résistances aux antibiotiques comme nous le verrons dans les paragraphes suivants.

Comme la plupart des BGN, *A. baumannii* expose à sa surface externe des exopolysaccharides (Figure 2). On retrouve chez *A. baumannii* un lipopolysaccharide (LPS) particulier, aussi appelé **lipooligasaccharide (LOS)**, composé d'un noyau polysaccharide couplé à un lipide A de la membrane externe sans antigène O. Un deuxième type d'exopolysaccharide, appelé **polysaccharide capsulaire (PSC)** ou antigène K, composé d'une chaine polysaccharidique, peut également se trouver à la surface de la membrane externe d'*A. baumannii* (Figure 2) (Geisinger et Isberg 2015). Cet exopolysaccharide de haut poids moléculaire (environ 200 kDa) confère aux souches d'*A. baumannii* qui le synthétisent un aspect mucoïde. Le polysaccharide nommée poly-ß-1-6-*N*-acetylglucosamine (PNAG) peut aussi se trouver à la surface de la membrane d'*A. baumannii* (Bentancor et al. 2012). Ces trois exopolysaccharides jouent un rôle important dans la virulence d'*A. baumannii* comme nous le verrons dans les paragraphes ci-dessous (Eveillard et al. 2010; Hu et al. 2020; Geisinger et Isberg 2015).

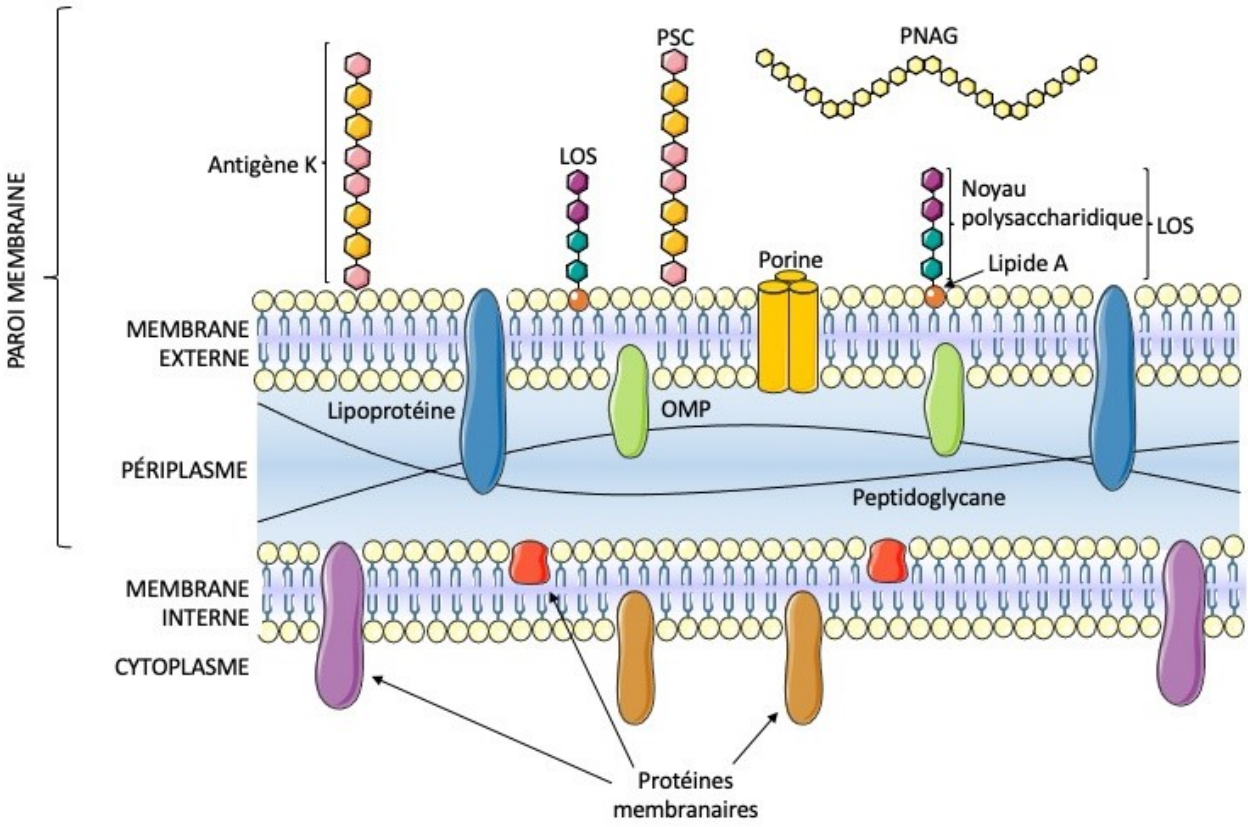


Figure 2. Schéma de la structure de la membrane d'*A. baumannii* – Adapté de Dahl 2008; Singh, Adams, and Brown 2019) – LOS : lipooligosaccharide ; OMP : *Outer membrane protein* ; PSC : polysaccharides capsulaires ; PNAG : poly-ß-1-6-*N*-acetylglucosamine – Créé avec Servier Medical Art

B. La corne d'abondance des facteurs de virulence d'*A. baumannii*

***A. baumannii* possède de nombreux facteurs de virulence**. Ces molécules lui permettent de pénétrer au sein des tissus/cellules, de se répliquer, d'échapper au système immunitaire de l'hôte, de persister dans l'organisme hôte, mais aussi de persister dans l'environnement hospitalier (Cross 2008; Morris et al. 2019). Les facteurs de virulence peuvent également participer à la résistance aux antibiotiques, cela sera abordé dans le paragraphe III. Résistances aux antibiotiques. Une liste non exhaustive des différentes molécules participant à la virulence d'*A. baumannii* est présentée dans le Tableau 3. Toutefois dans cette partie, nous nous focaliserons sur les facteurs de virulence pouvant expliquer les raisons pour lesquelles cet agent pathogène survit dans son hôte et dans les milieux hospitaliers.

Tableau 3. Facteurs de virulence d'*A. baumannii* – Adapté de (Morris et al. 2019; Tipton et al. 2018; Jun et al. 2013; Agarwal et al. 2019)

	Noms des facteurs de virulence	Fonctions
Composants de la membrane externe	Protéine de la membrane externe OmpA	• Réduction de la perméabilité membranaire. (Nitzan, Deutsch, et Pechatnikov 2002) • Induction de la cytotoxicité après fixation aux récepteurs de mort des cellules hôtes. (Choi et al. 2008; Gaddy, Tomaras, et Actis 2009) • Adhésion aux cellules hôtes par interaction avec la fibronectine. (Smani et al. 2014; Choi et al. 2005; 2008) • Résistance à la destruction par le système du complément. (Sanchez-Larrayoz et al. 2017)
	Protéine de la membrane externe Omp34	• Cytotoxicité via l'activation des caspases et inhibition de l'autophagie des cellules hôtes. • Résistance à l'imipénème.
	Protéine de la membrane externe OmpW	• Survie dans l'organisme hôte par la facilitation de l'acquisition de fer.
	Lipooligosaccharides (LOS)	• Induction de choc septique. (Moffatt et al. 2013; L. Lin et al. 2012) • Résistance au peptide antimicrobien LL-37. (Moffatt et al. 2013)
	Polysaccharides capsulaires (PSC)	• Résistance au sérum. (Tipton et al. 2018; Hu et al. 2020; Geisinger et Isberg 2015) • Résistance aux désinfectants, au lysozyme et à la dessiccation. (Tipton et al. 2018) • Résistance à la destruction par le système du complément. • Formation du biofilm.
Facteurs extracellulaires	Phospholipases C et D	• Hémolyse. • Survie dans l'organisme hôte par la facilitation de l'acquisition du fer. • Résistance au sérum. • Invasion des cellules épithéliales.

	Poly-ß-1-6-*N*-acetylglucosamine (PNAG)	• Formation du biofilm de biofilms adhérents.
	Vésicules de la membrane externe (OMVs)	• Modulation de l'échappement au système immunitaire. • Dissémination de matériel génétique. • Sécrétion des facteurs de virulence, de toxines et autres molécules effectrices dans le milieu extracellulaire.
Systèmes de sécrétion	Systèmes de sécrétion de type I, II, III, IV et V	• Sécrétion de molécules dans l'environnement extracellulaire. • Transfert de matériel génétique (ADN, plasmides ou autres éléments génétiques mobiles) entre bactéries. • Formation du biofilm. • Liaison aux protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale des cellules hôtes.
	Systèmes d'efflux : AceI et AdeABC	• Résistance aux biocides. • Participe au *fitness cost* et à la persistance *in vivo*.
Acquisition de nutriments	Production de sidérophores	• Survie dans l'environnement par la facilitation de l'acquisition de fer.
	Production de calprotectine	• Survie dans l'environnement par la facilitation de l'acquisition de zinc et manganèse.
Interactions communautaires	*Quorum sensing*	• Sentir, répondre et communiquer avec les bactéries environnantes. (Subhadra et al. 2016) • Maturation du biofilm. (Niu et al. 2008; Anbazhagan et al. 2012; Subhadra et al. 2016)
	Formation de biofilms adhérents	• Participer à la survie dans les milieux hospitaliers ou en cas de conditions défavorables.(Chapartegui-González et al. 2018) • Adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques.

1. Les outer membrane proteins (OMPs)

Les protéines membranaires OMPs jouent un rôle majeur dans la pathogénicité d'*A. baumannii* (Sato et al. 2017). En effet, ces protéines immunogènes leur confèrent des avantages liés à l'adaptation à l'hôte, notamment à l'évasion immunitaire, la tolérance au stress et la résistance aux antibiotiques et aux antibactériens (Uppalapati, Sett, et Pathania 2020).

Nous prendrons ici l'exemple de la porine OmpA (anciennement appelée Omp38) qui est le facteur de virulence d'*A. baumannii* le plus décrit et étudié. La porine OmpA chez *A.* baumannii est aussi appelée HMP-AB ou OmpAb (Sugawara et Nikaido 2012). Elle est fortement conservée chez *A. baumannii* : sur 103 isolats étudiés, 80,5% d'entre elles avaient une identité de séquence à plus de 99%. Cette protéine est également très fortement représentée dans la membrane externe des *Enterobacteriaceae* (Choi et al. 2008; Gribun et al. 2003b).

De plus, **la protéine OmpA est un marqueur de la sévérité des PAVM et bactériémies**. En effet, une surexpression du gène codant pour la protéine OmpA a été montrée comme cliniquement associée à la survenue de ces deux d'infections associées aux soins, mais aussi à une augmentation de la mortalité des patients infectés (Sánchez-Encinales et al. 2017).

La protéine **OmpA joue un rôle majeur dans la pathogénicité** ainsi que dans la résistance aux antibiotiques. L'interaction entre le domaine C-terminal de OmpA et le peptidoglycane permet à la bactérie de réguler la formation des vésicules de membrane externe (OMVs, pour *outer membrane vésicules*). Ces structures sphériques, de 20 à 250 nm de diamètre, se détachent de la membrane externe en encapsulant par la même occasion les contenants périplasmiques, une partie de la membrane interne et du cytoplasme bactérien (Skerniškytė et al. 2021). Elles sont ainsi composées de lipides, de protéines membranaires, de LOS et peuvent parfois contenir des acides nucléiques cytoplasmiques. Les OMVs permettent à de nombreuses BGN telles qu'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *Helicobacter pylori* de sécréter des facteurs de virulence, des toxines et autres molécules effectrices dans le milieu extracellulaire afin de cibler les cellules hôtes (Agarwal et al. 2019).

La protéine OmpA module également d'autres fonctions dont la résistance à la lyse par le système du complément (Sanchez-Larrayoz et al. 2017) et à l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire des cellules hôtes, mais aussi dans la mort de celles-ci (Choi et al. 2008;

Gaddy, Tomaras, et Actis 2009). En effet pour cela, OmpA interagit avec la fibronectine présente à la membrane de la cellule hôte, et permet ainsi à la bactérie d'être internalisée dans la cellule hôte (Smani et al. 2014; Choi et al. 2005; 2008). *A. baumannii* va ensuite migrer au niveau de la mitochondrie et induire, notamment grâce à la protéine OmpA, une sécrétion de cytochrome C dans le cytosol qui va conduire à l'apoptose de la cellule hôte (Choi et al. 2005). La bactérie peut être aussi internalisée dans le noyau de la cellule hôte, où elle va induire la dégradation du l'ADN dans un premier temps puis l'apoptose de la cellule hôte (Choi et al. 2005; 2008). Les OMVs contenant la protéine OmpA peuvent également induire l'apoptose de ces cellules en suivant les mécanismes précédemment cités (Tiku et al. 2021).

2. Les exopolysaccharides de surface

Le exopolysaccharides de surface (LOS et PSC) sont synthétisés dans le cytoplasme puis exportés vers la membrane externe par une machinerie protéique qui leur est propre.

a. Le lipooligosaccharide (LOS)

La voie de biosynthèse du LOS est illustrée dans la Figure 3. Le lipide A du LOS est synthétisé dans le cytoplasme grâce de la cascade de signalisation de Raetz, à la suite de laquelle il est ancré à la membrane interne sur sa face cytoplasmique (Sabnis et al. 2021; Powers et Trent 2018). Puis, le cœur saccharidique est ajouté par les glycosyltransférases formant ainsi le LOS. Ce dernier est ensuite transloqué sur le versant périplasmique de la membrane interne par la translocase MsbA, puis le LOS est exporté vers la membrane externe par le complexe protéique LptABCDEFG.

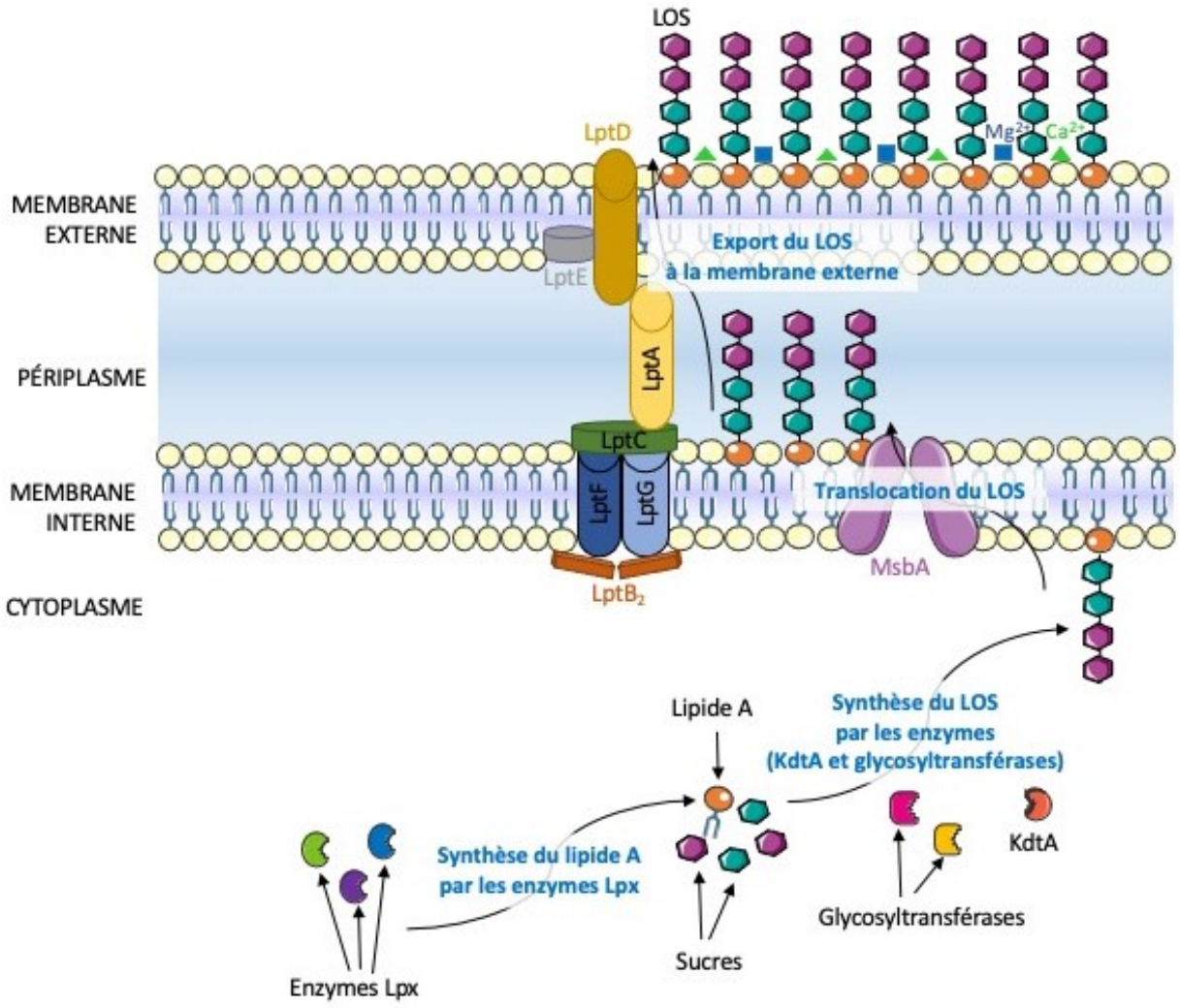


Figure 3. Schéma de la voie de biosynthèse du lipooligasaccharide (LOS) – Adapté de Powers and Trent 2018, Créé avec Servier Medical Art

Le LOS d'*A. baumannii* joue un rôle important dans la virulence *in vivo*. Grâce à son lipide A le LOS induit une réponse immunitaire pro-inflammatoire importante pour l'évolution de l'infection lorsqu'il est reconnu par les récepteurs *Toll-Like Receptors* (TLRs) TLR4 exprimés par les cellules hôtes immunitaires (Moffatt et al. 2013; L. Lin et al. 2012). Cette réponse inflammatoire peut être importante pour la clairance bactérienne, mais si elle n'est pas régulée, elle peut entraîner une production excessive de cytokines pro-inflammatoires conduisant à un choc septique (Moffatt et al. 2013). Il a été montré, à l'aide d'un modèle murin de bactériémie, que la virulence d'*A. baumannii* est médiée par la perte du LOS au cours de la croissance bactérienne (L. Lin et al. 2012). Chez des souris C3H et C57BL/6, la virulence de différentes souches cliniques d'*A. baumannii* isolées à partir de divers échantillons biologiques

(sang, expectoration, lavage broncho-alvéolaire, aspiration endotrachéale, blessure) a été corrélée à leur capacité à excréter des LOS dans le surnageant de culture. Les souches d'*A. baumannii* les plus virulentes entrainaient une réponse pro-inflammatoire non régulée et donc un choc septique chez les souris sauvages, alors que les souris n'exprimant pas de TLR4 étaient protégées contre l'infection létale.

Il a été également montré que le LOS participe à la résistance au peptide antimicrobien LL-37, un composant du sérum humain produit par les neutrophiles et diverses cellules épithéliales (Moffatt et al. 2013). Le LL-37 présente une grande affinité pour le LOS et se lie aux membranes bactériennes par une interaction électrostatique. Dans cette étude *in vitro*, il a été montré que la souche de laboratoire sauvage d'*A. baumannii* (exprimant le LOS), survivait à de plus fortes concentrations en LL-37 que la souche déficiente en LOS.

Le LOS est également impliqué dans la résistance aux antibiotiques, notamment à la classe des polymyxines (Lesho et al. 2013; Beceiro et al. 2011; Trebosc et al. 2019; Moffatt et al. 2010). Ce mécanisme sera décrit plus en détail dans le Chapitre 2.

b. Les exopolysaccharides capsulaires (PSC)

Les bactéries du genre *Acinetobacter* peuvent produire une capsule extracellulaire qui constitue une **couche de protection contre les menaces extérieures,** telles que la destruction par le complément (Russo et al. 2010).

Chez *A. baumannii*, tous les gènes impliqués dans la synthèse de la capsule sont regroupés au niveau du locus K (Singh, Adams, et Brown 2019; Hu et al. 2020). Comme illustré sur la Figure 4, les PSC sont synthétisés au niveau de la membrane interne sur son versant cytoplasmique par la transférase initiatrice ItrA et des glycosyltransférases spécifiques Gtr. Ces enzymes assemblent une molécule d'udécaprényl-pyrophosphate (Und-P) avec 4 à 6 sucres pour former une courte chaine appelée l'unité K (Singh, Adams, et Brown 2019). Cette unité K est ensuite transférée sur le versant périplasmique de la membrane interne par la translocase Wzx. L'enzyme Wzy polymérise l'unité K en transférant la chaine polysaccharidique en croissance du transporteur Und-P à l'unité K suivante. Une fois le PSC synthétisé, il est exporté vers la membrane externe par le complexe protéique Wza/Wzb/Wzc.

Les PSC permettent à *A. baumannii* d'échapper au système immunitaire de son hôte (Tipton et al. 2018; Hu et al. 2020). En effet, il a été démontré que lorsque les gènes régulant la formation de la capsule (*itrA* et *wzc*) sont non fonctionnels, les mutants non encapsulés étaient rapidement éliminés par le sérum *in vitro*. Cela été également observé *ex vivo* et *in vivo* dans un modèle murin de bactériémie avec des souches d'*A. baumannii* (Geisinger et Isberg 2015).

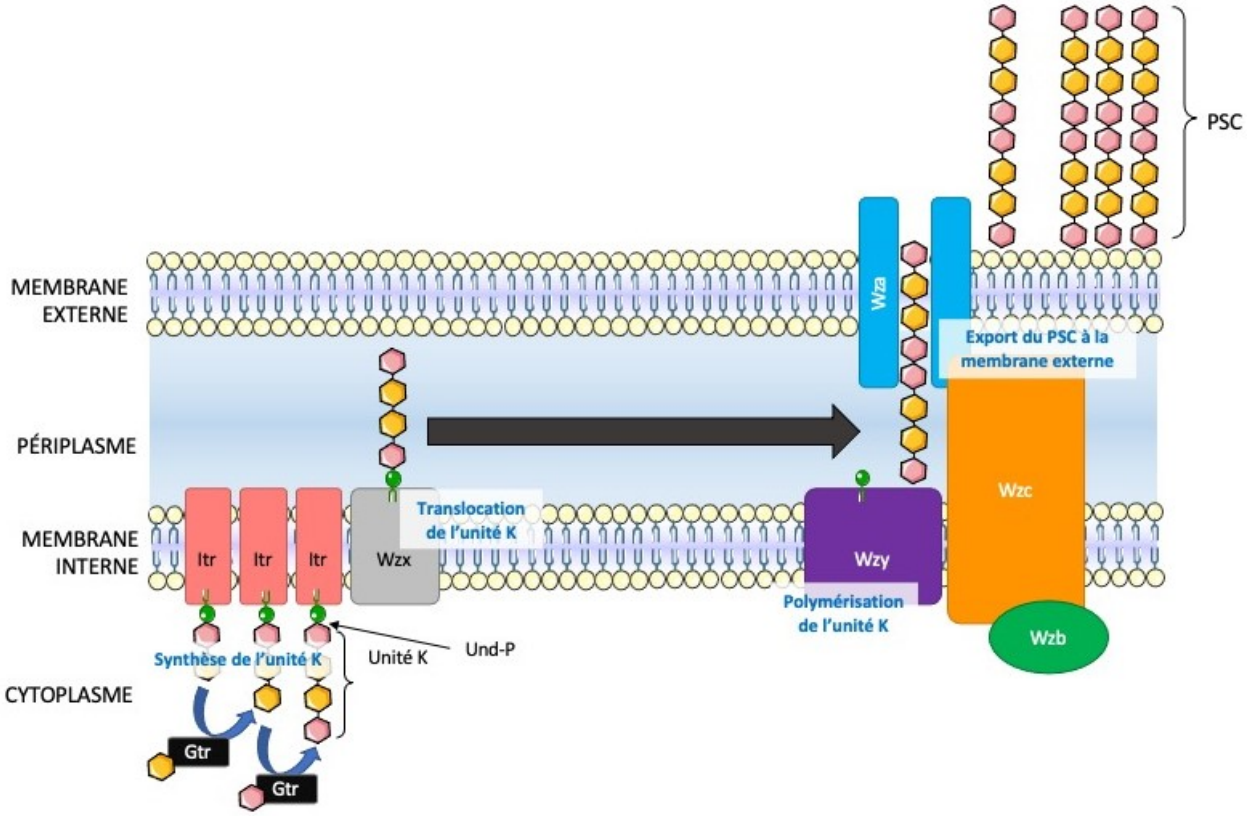


Figure 4. Schéma de la voie de biosynthèse des polysaccharides capsulaire (PSC) – Adapté de Singh, Adams, and Brown 2019, Créé avec Servier Medical Art

De plus, Tipton *et al.* ont également démontré grâce à une expérience de mutagenèse sur le gène *wzc* avec souches produisant plus ou moins des PSC, que **la capsule jouait un rôle important dans la résistance à la dessiccation, mais aussi aux désinfectants** utilisés dans les milieux hospitaliers tels que le chlorure de benzalkonium, chlorure de benzéthonium et la gluconate de chlorhexidine (Tipton et al. 2018).

3. Le *quorum sensing,* un mode de communication entre les bactéries

Le *quorum sensing* est le mode de communication utilisé par toutes les bactéries (Subhadra et al. 2016; Bulitta et al. 2009; 2010). Le *quorum sensing* leur permet de réguler leur densité de population, mais aussi de s'adapter à l'environnement. Pour cela, les bactéries sécrètent dans le milieu extracellulaire des petites molécules, diffusibles appelée des auto-inducteurs (Subhadra et al. 2016). Le *quorum sensing* repose principalement sur la densité cellulaire puisqu'il faut atteindre une concentration seuil en auto-inducteurs, et donc une densité bactérienne importante, pour qu'une communication de cellule à cellule soit établie. **Il existe une corrélation spécifique entre le système *quorum sensing* et la production de facteurs de virulence, la motilité, le transfert de matériel génétique (plasmide), et la formation de biofilms** (Subhadra et al. 2016). Par exemple, chez *P. aeruginosa*, que la production de facteurs de virulence induisant des dommages tissulaires chez l'hôte, tels que les protéases ou les hémolysines, est régulée par des molécules du *quorum sensing* (Whitehead et al. 2001).

Les auto-inducteurs se lient spécifiquement à des senseurs exerçant la fonction de facteurs transcriptionnels, qui vont entraîner une modification de l'expression de gènes codant pour diverses protéines dans l'ensemble de la population. Les BGN dont les bactéries du genre *Acinetobacter*, produisent majoritaires des auto-inducteurs de la famille des *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs), mais elles peuvent aussi produire des quinolones et des dikétopipérazines (Holden, Swift, et Williams 2000). Les AHLs sont petites molécules lipidiques neutres composées d'un cycle homo-sérine lactone et d'une chaîne acyle. Les *Acinetobacter* ssp. produisent jusqu'à cinq molécules de signal différentes, qui sont détectées en plus grande abondance durant la phase stationnaire de croissance (González, Nusblat, et Nudel 2001). Cependant, la sécrétion d'auto-inducteurs, n'est pas corrélée à la virulence des souches d'*Acinetobacter* ssp. (González et al. 2009).

Chez *A. baumannii*, le *quorum sensing* est médié par un système à double composante homologue au système LuxI/LuxR typique des BGN tels que *P. aeruginosa* et *E. coli*, le système AbaI/AbaR (Figure 5). Ce système comprend une protéine senseur, AbaI qui fonctionne comme auto-inducteur synthase (c'est-à-dire qui active la synthèse de l'auto-inducteur), et AbaR qui fonctionne comme protéine réceptrice pour les AHL induisant une cascade de signalisation. Ainsi, comme illustré sur la Figure 5, lorsque la concentration seuil en AHL dans le milieu extracellulaire est atteinte, les AHL vont diffuser à l'intérieur de la bactérie et se fixer

à la protéine intracellulaire AbaR. Le complexe AHL/AbaR va ensuite induire la transcription du gène codant pour la protéine AbaI qui à terme va catalyser la synthèse d'AHLs qui vont diffuser ou être exportés vers le milieu extracellulaire, selon la longueur de la chaine acyle (Irie et Parsek 2008; Niu et al. 2008). Les AHLs dont la chaîne acyle est courtes (4-8 atomes de carbone) vont diffuser à travers la membrane vers l'extérieur de la bactérie et celles dont la chaine acyle est longue (10-14 atomes de carbone) sont transportées par un système d'efflux (Irie et Parsek 2008). **Le complexe AHL/AbaR va également entrainer la modification de l'expression de gènes codant pour diverses protéines, comme ceux participant à la maturation du biofilm bactérien** (Niu et al. 2008; Anbazhagan et al. 2012; Subhadra et al. 2016). En effet, il a été montré à l'aide de souches d'*A. baumannii* mutantes pour le gène *abaI*, qu'en cas d'altération du système du *quorum sensing* les dernières étapes de la formation de biofilms était altérées. Ces souches mutantes pour *abaI* ont été ensuite mises en culture avec des AHLs extraits du surnageant de culture d'une souche sauvage ; il en résulte que le phénotype sauvage, à savoir la formation d'un biofilm mature, était restauré.

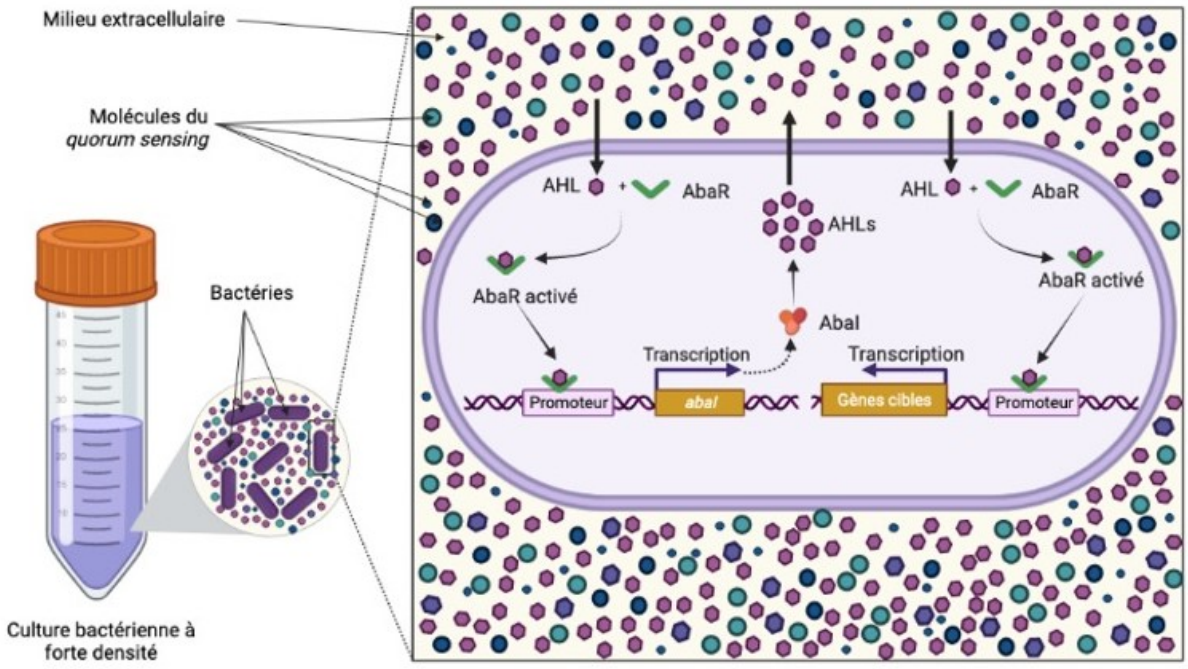


Figure 5. Schéma du mécanisme du *quorum sensing* chez *A. baumannii* – Créé avec bioRender.com

4. La formation de biofilms adhérents biotiques et abiotiques

A. baumannii peut vivre à l'état planctonique, mais peut aussi former des biofilms bactériens adhérents sur des surfaces biotiques comme les plaies. Ce mode de vie pourrait aussi être à l'origine des **transmissions croisées observées via l'environnement hospitalier**, tel que les lits des patients, les rideaux des chambres hospitalières, le matériel souillé (oxymètre de pouls, les électrodes, masques à oxygène, etc.) et les mains du personnel soignant ont été observées (Das et al. 2002; Aygün et al. 2002; Bernards et al. 1998).

Les biofilms adhérents se forment en plusieurs étapes comme illustré sur la Figure 6. Au cours de **l'adhésion initiale**, les bactéries planctoniques vont s'attacher entre elles et se fixer aux surfaces. On parle alors de bactéries sessiles. Puis durant le **développement précoce** du biofilm, les bactéries se multiplient et synthétisent une matrice extracellulaire composée de sucres tels que le PNAG, des protéines et d'ADN. L'organisation des bactéries au sein du biofilm est rendue possible par la matrice extracellulaire qui lui confère une stabilité. Cette matrice constitue une interface d'échange entre les bactéries et l'environnement. Elle joue ainsi le rôle de barrière contre les agressions extérieures, telles que les antibiotiques, mais aussi de source nutritive en eau et nutriments. À l'issue du développement d'une structure tridimensionnelle, on parle de **biofilms matures**. Ils sont composés d'une population bactérienne hétérogène : on y retrouve des bactéries sessiles et, au niveau basal, des bactéries dormantes dont la croissance est faible. Les bactéries évoluent et interagissent par des relations compétitives et synergiques, notamment grâce aux molécules du *quorum sensing*. De plus, la forte proximité entre les bactéries favorise l'échange d'éléments génétiques (plasmides, fragments d'ADN, gènes de résistances). Enfin, une **dispersion du biofilm** a lieu par détachement de mini-agrégats pouvant ainsi coloniser d'autres surfaces (A. Smith 2005; « Biofilms bactériens et santé » 2020).

Le mode de vie sous la forme de biofilms bactériens contribue à la survie et à la propagation d'*A. baumannii* dans les milieux hospitaliers (Chapartegui-González et al. 2018). En effet, Chapartegui-González *et al.* ont montré qu'*A. baumannii* peut survire longtemps (jusqu'au moins 60 j) sur des surfaces sèches telles que le verre, le plastique ou encore des blouses en coton. De plus, ils ont démontré qu'*A. baumannii* avait la capacité de résister relativement bien à la dessiccation et donc à la carence nutritive puisqu'en moyenne, la cultivabilité d'*A. baumannii* a été réduite de 46,66%, 40,40%, 71,78%, et 11,94% en condition de carence sur

du plastique, du verre, sur tissus des blouses, et en solution saline, respectivement. La capacité à former des biofilms d'*A. baumannii,* donc sa virulence, ne sont pas impactées par une longue période de carence nutritive et de dessiccation (Chapartegui-González et al. 2018).

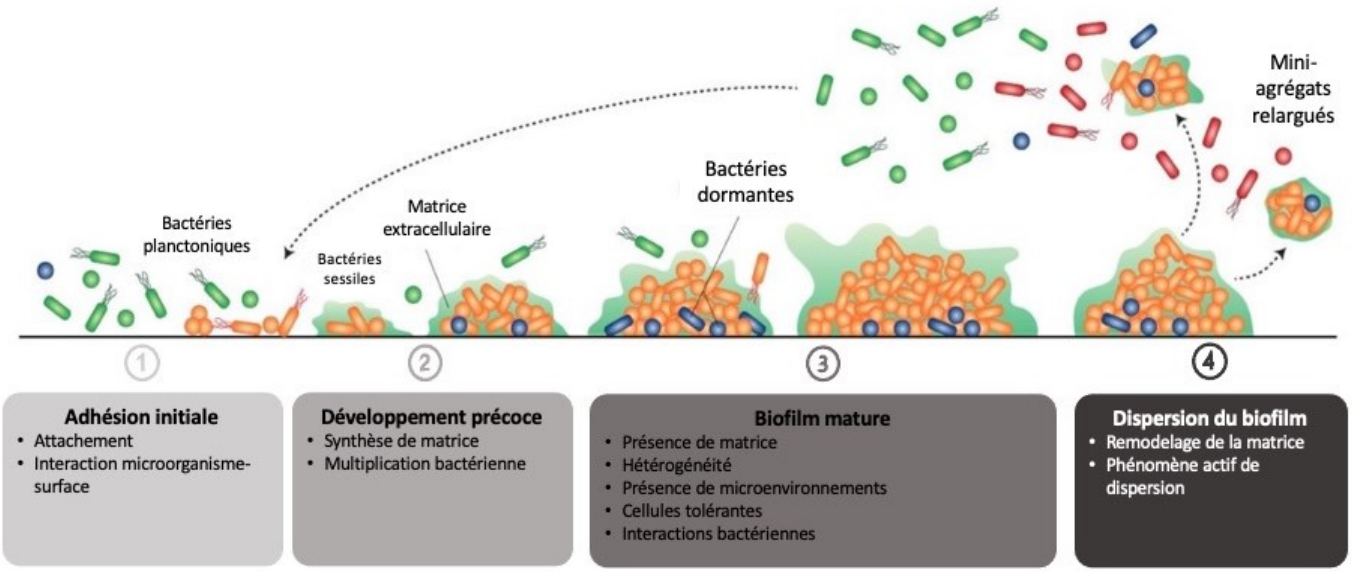


Figure 6. Formation d'un biofilm bactérien (Adapté de ("Biofilms bactériens et santé" 2020)

III. Résistances aux antibiotiques

Au cours de ces dernières années, une **augmentation des souches *Acinetobacter spp.* multirésistantes aux antibiotiques a été observée en Europe**, comme illustrée par la Figure 7, **mais aussi à l'échelle mondiale**. Selon le *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), en France, le pourcentage de souches isolées d'*Acinetobacter* spp. résistantes à la fois aux aminosides, fluoroquinolones et carbapénèmes a augmenté de 4,5% entre 2012 (4%) et 2019 (8,5%) (« Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial Resistance » s. d.). Toutefois, une grande différence de sensibilité aux antibiotiques est observée entre les bactéries *Acinetobacter* spp, avec ***A. baumannii* l'espèce la plus résistante aux antibiotiques** (Seifert et al. 1993).

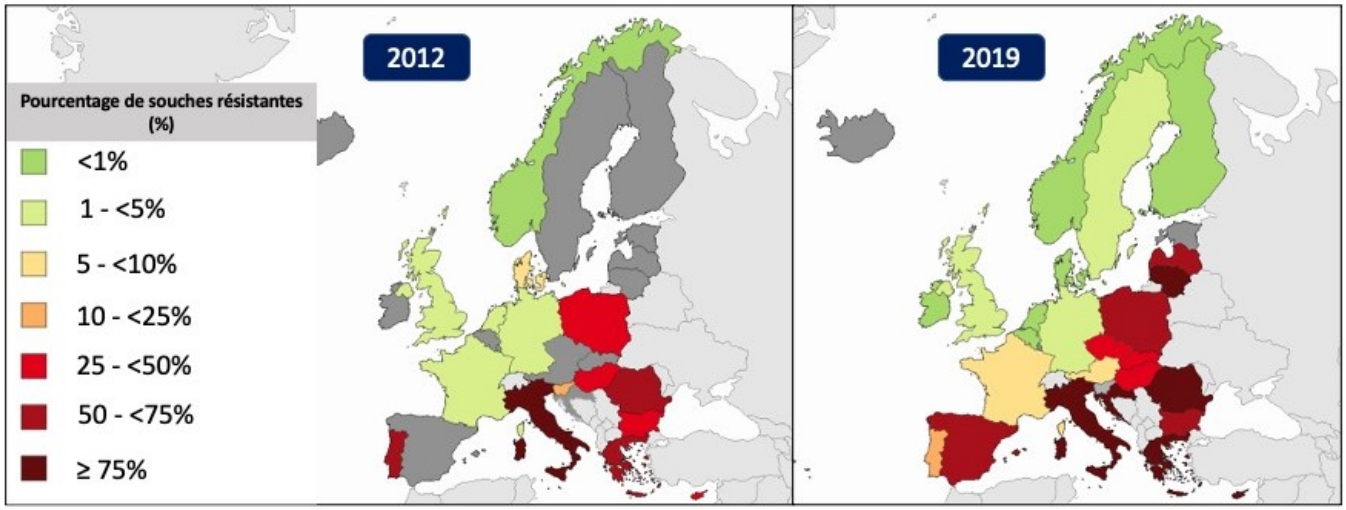


Figure 7. Pourcentage d'isolats d'*Acinetobacter* spp. résistants aux fluoroquinolones, aminosides et carbapénèmes) dans les pays européens en 2012 (à gauche) et en 2019 (à droite) – Adapté des données de l'ECDC

***A. baumannii* possède des mécanismes de résistance naturels aux antibiotiques, mais aussi des mécanismes de résistance acquis**. Grâce à sa plasticité génomique, cet agent pathogène intègre facilement des éléments génétiques dans son génome qui lui permettent de développer des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques et ce même en cours de traitement (D. Wong et al. 2017; Jordi Vila, Martí, et Sánchez-Céspedes 2007).

Ainsi, ***A. baumannii* possède un îlot de résistance, nommé *AbaR*, qui peut contenir jusqu'à 45 gènes de résistance selon la souche d'*A. baumannii* considérée** (D. Wong et al. 2017; Leal et al. 2020). Cet îlot est composé d'éléments génétiques mobiles tels que les transposons, les intégrons, les séquences d'insertion (IS) et les plasmides (Adams et al. 2008; Blackwell, Hamidian, et Hall 2016). Ces éléments sont des portions d'ADN qui ont la capacité de se transférer d'un endroit à un autre du génome bactérien (Pagano, Martins, et Barth 2016). Ils peuvent être aussi transmis d'une bactérie à l'autre par transfert horizontal inter- et intra-espèce. Ces transpositions sont considérées comme l'une des principales causes des réarrangements de l'ADN bactérien (Pagano, Martins, et Barth 2016).

Depuis la fin des années 70, *A. baumannii* est devenue résistante aux ß-lactamines, aux tétracyclines, aux aminosides, aux sulfamides et aux polymyxines. Tous les mécanismes de résistance aux antibiotiques ayant été identifiés chez *A. baumannii* sont résumés dans le Tableau 4. Toutefois comme mentionné dans l'introduction, la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii* constitue aujourd'hui un défi thérapeutique du fait de l'augmentation du nombre de souches résistantes aux carbapénèmes, comme illustrée sur la Figure 8. Ainsi, seuls les mécanismes de résistances aux ß-lactamines (classe à laquelle appartiennent les carbapénèmes) seront détaillés dans le paragraphe suivant.

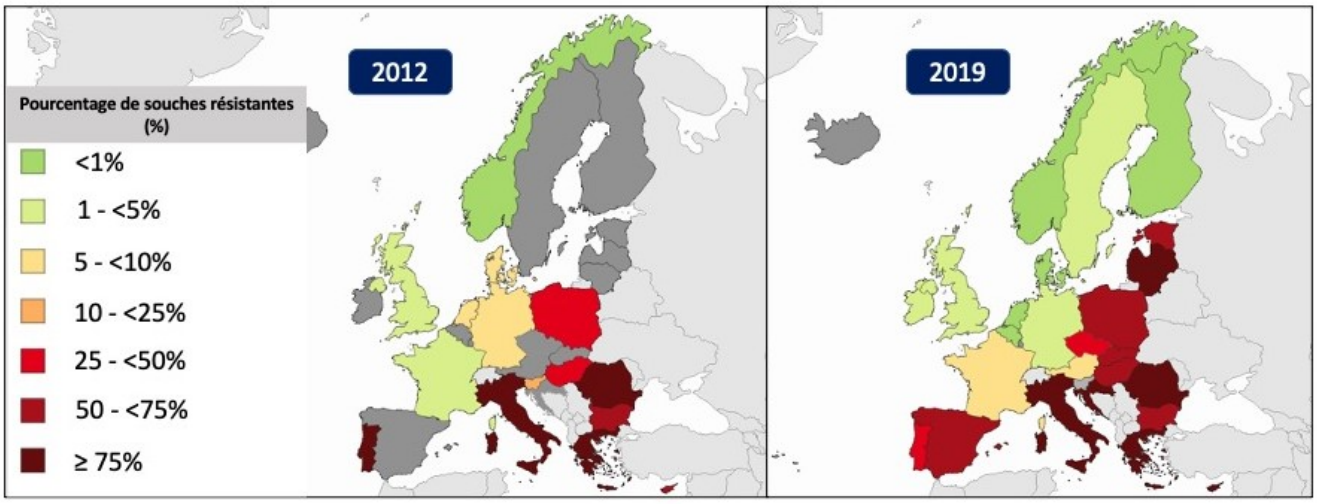


Figure 8. Pourcentage d'isolats d'*Acinetobacter* spp. résistants aux carbapénèmes dans les pays européens en 2012 (à gauche) et en 2019 (à droite) – Adapté des données de l'ECDC

Tableau 4. Mécanismes de résistances aux antibiotiques d'*A. baumannii* – Adapté de (Garnacho-Montero et Timsit 2019; Peleg, Seifert, et Paterson 2008; Geisinger et Isberg 2015)

Classes d'antibiotiques	**Mécanismes de résistances**	**Enzymes impliquées**
ß-lactamines	Expression de ß-lactamases	Céphalosporinases (AmpC), ß-lactamase à spectre étendu (VEB, PER, TEM, CTX-M et SHV), Carbapénèmases (OXA-58, OXA-28, OXA-23, OXA-51), Métallo-ß-lactamases (IMP, SPM, VIM, NDM, SIM, KHM, GIM, AIM)
	Réduction de l'expression de protéines membranaires OMPs	CarO, OMPs de 22-, 33- à 37-, 44-, 47- kDa, HMP-AB, Porine homologue de OprD et OmpW
	Expression de pompes d'efflux non spécifiques	AdeABC
	Mutation des protéines liant les pénicillines	Protéines liant les pénicillines mutées
Aminosides	Expression d'enzymes de modification d'aminosides	Acétyltransférases, Nucléotidyltransférases, Phosphotransférases
	Méthylation de l'ARN ribosomal 16S	
	Expression de pompes d'efflux non spécifiques	AdeABC et AdeM
Fluoroquinolones	Modification du site de fixation des fluoroquinolones par mutations chromosomiques	GyrA et/ou ParC
	Expression de pompes non spécifiques d'efflux	AdeABC, AdeM

Phénicolés	Expression de pompes d'efflux spécifiques	CmlA
	Production de la capsule	
Macrolides	Production de la capsule	
Cyclines	Expression de pompes d'efflux spécifiques	Tet (A) et Tet(B)
	Protection ribosomale	Tet(M)
	Expression de pompe d'efflux non spécifiques	AdeABC
Polymyxines	Altération du lipide A (composant du LOS)	Mutations génétiques dans le système à double composante PmrA-PmarB
	Perte du LOS	Mutations génétiques au sein des gènes participant à la synthèse du LOS (*lpxA*, *lpxC* et/ou *lpxD*)

Mécanismes de résistances aux ß-lactamines

De multiples mécanismes fonctionnant souvent conjointement, tels que les porines, les pompes d'efflux et les ß-lactamases, rendent *A. baumannii* naturellement résistant à certains antibiotiques de la classe des ß-lactamines (Germán Bou et al. 2000; Fernández-Cuenca et al. 2003; Quale et al. 2003). En effet, par rapport aux autres BGN, comme *P. aeruginosa* et *E. coli*, la membrane externe d'*A. baumannii* est peu perméable (< 5%), car *A. baumannii* exprime peu de porines. *A. baumannii* exprime aussi des pompes d'efflux constitutives au niveau de sa membrane externe qui la rendent naturellement résistante à certaines ß-lactamines (Jordi Vila, Martí, et Sánchez-Céspedes 2007). *A. baumannii* possède aussi des mécanismes de résistance enzymatiques tels les ß-lactamases. Le mécanisme le plus répandu de résistance aux β-lactamines chez *A. baumannii* est l'expression de ß-lactamases (Fernández-Cuenca et al. 2003). Toutefois, une modification des cibles de ß-lactamines, les protéines liant les pénicillines (PLPs), et la surexpression de pompes d'efflux, mais aussi une modification des porines ou de leur expression ont été également identifiés comme participant à la résistance aux ß-lactamines chez *A. baumannii* (Alkasaby et El Sayed Zaki 2017).

1. Les porines

Chez les bactéries à Gram négatif, les porines peuvent participer à la résistance aux antibiotiques selon des mécanismes différents (**Figure 9**). En effet, la résistance aux antibiotiques via les porines peut être due à :

- Une diminution de la synthèse la porine sauvage
- Expression d'une porine dont le canal est plus étroit
- La synthèse de sous-unités mutées ne reconnaissant plus le substrat de la porine sauvage (non mutée)

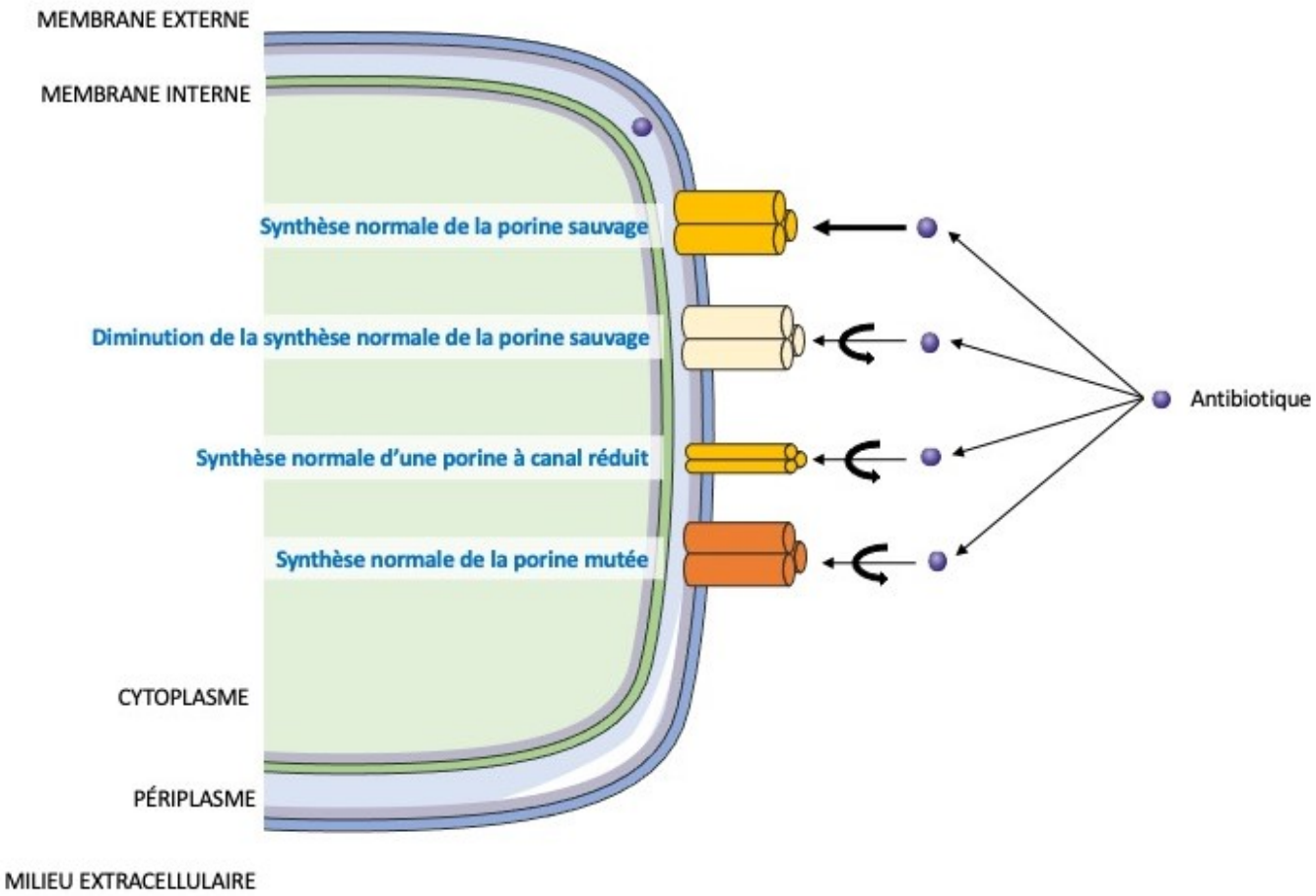


Figure 9. Schéma des mécanismes de résistance aux antibiotiques grâce aux porines – Adapté de (Pagès, James, et Winterhalter 2008), Créé avec Servier Medical Art

Chez *A. baumannii,* la résistance via les porines se fait par une synthèse réduite des porines qui se traduit par une faible expression des porines à la membrane (Catel-Ferreira et al. 2012).

La porine principalement retrouvée chez *A. baumannii* est la protéine OmpA (Gribun et al. 2003a; Sugawara et Nikaido 2012). Cette porine oligomérique permet une diffusion plus lente (par rapport aux porines monomériques) des ß-lactamines chargées négativement à l'intérieur de la bactérie (Nitzan, Deutsch, et Pechatnikov 2002; Sugawara et Nikaido 2012). Il a été montré qu'OmpA participe ainsi à la résistance naturelle d'*A. baumannii* à l'aztréonam, la colistine, l'imipénème, la gentamicine et au triméthoprime en maintenant l'intégrité de la membrane externe chez *A. baumannii* (Kwon et al. 2017). Pour cela, Know et son équipe ont réalisé des mesures de concentrations minimales inhibitrices (CMI) de plusieurs antibiotiques avec des souches mutantes pour le gène codant la protéine OmpA et une souche sauvage

comme contrôle (Kwon et al. 2017). Les mutations testées conduisaient soit à une perte totale de la protéine OmpA, soit à l'expression d'une OmpA tronquée à niveau de la partie C-terminale interagissant avec le peptidoglycane situé dans le périplasme. La souche sauvage et les souches mutantes totales pour OmpA présentaient la même sensibilité à tous les antibiotiques testés, alors que la souche présentant une protéine tronquée a vu les CMI diminuer d'un facteur 2 pour les antibiotiques précédemment cités confirmant le rôle clé de la protéine OmpA dans la résistance naturelle aux antibiotiques chez *A. baumannii.* De plus, OmpA en régulant la formation des OMVs, elle participe également à la transmission des gènes de résistance aux carbapénèmes entre différentes souches d'*A. baumannii* (Agarwal et al. 2019). Les OMVs permettent également de siphonner les antibiotiques, tels que les ß-lactamines, présents dans le milieu extracellulaire grâce aux ß-lactamases, carbapénamases et pompes d'efflux qu'elles contiennent (Agarwal et al. 2019; Jun et al. 2013).

Les OMPs de 22, 33 à 37, 43, 44, 47 kDa, *carbapenem-associated OMP* (CarO), OmpW et la porine homologue de OprD de *P. aeruginosa* ont été également identifiées comme participant à la résistance aux ß-lactamines, tels que l'imipenème, le méropénème, pais aussi à l'acide clavulanique, le céfépime chez des couches cliniques d'*A. baumannii* (Quale et al. 2003; Germán Bou et al. 2000; Clark 1996; Dupont et al. 2005; Siroy et al. 2006).

2. Les pompes d'efflux

Les pompes d'efflux permettent l'expulsion hors de la bactérie des antibiotiques ayant pénétré dans la bactérie. Certaines sont localisées sur la membrane interne bactérienne, les antibiotiques pris en charge par ces pompes d'efflux sont alors expulsés hors la bactérie grâce à une protéine membranaire Omp (Figure 10). C'est le cas des pompes d'efflux de la amille des *ATB binding cassette* (ABC), la famille des *major facilitator superfamily* (MFS), la famille des *small multidrug resistance* (SMR), la famille des *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) et la famille des *proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE) (Blanco et al. 2016). Les pompes d'efflux ABC utilisent les molécules d'ATP comme source d'énergie pour permettre le passage la membrane interne. Les pompes d'efflux des familles MFS, SMR, MATE et PACE, fonctionnent selon le même procédé avec comme source d'énergie des protons transportés dans le sens inverse du gradient. La famille des *resistance-nodulation-division* (RND) constitue la 6ème famille des pompes d'efflux pouvant être retrouvées chez les bactéries

(Figure 10). Les pompes d'efflux de type RND sont constituées d'antiports de protons qui permettent l'expulsion des antibiotiques directement hors de la bactérie (Blanco et al. 2016). Les pompes d'efflux MFS, ABC, SMR et MATE sont largement répandues chez les BGN et BGP, alors que les pompes d'efflux RND et PACE sont exclusivement retrouvées chez les BGN (Blanco et al. 2016; Hassan et al. 2018).

Les pompes d'efflux qui ont été identifiées chez *A. baumannii* appartiennent aux familles des MFS, RND ABC et MATE, et sont résumées dans le Tableau 5 (Jordi Vila, Martí, et Sánchez-Céspedes 2007; Okada et al. 2017). Seule la pompe d'efflux AdeABC de la famille des RND a été identifiées comme impliquée dans la résistance au ß-lactamines chez une souche clinque d'*A. baumannii* isolée chez un patient présentant une infection urinaire (Magnet, Courvalin, et Lambert 2001).

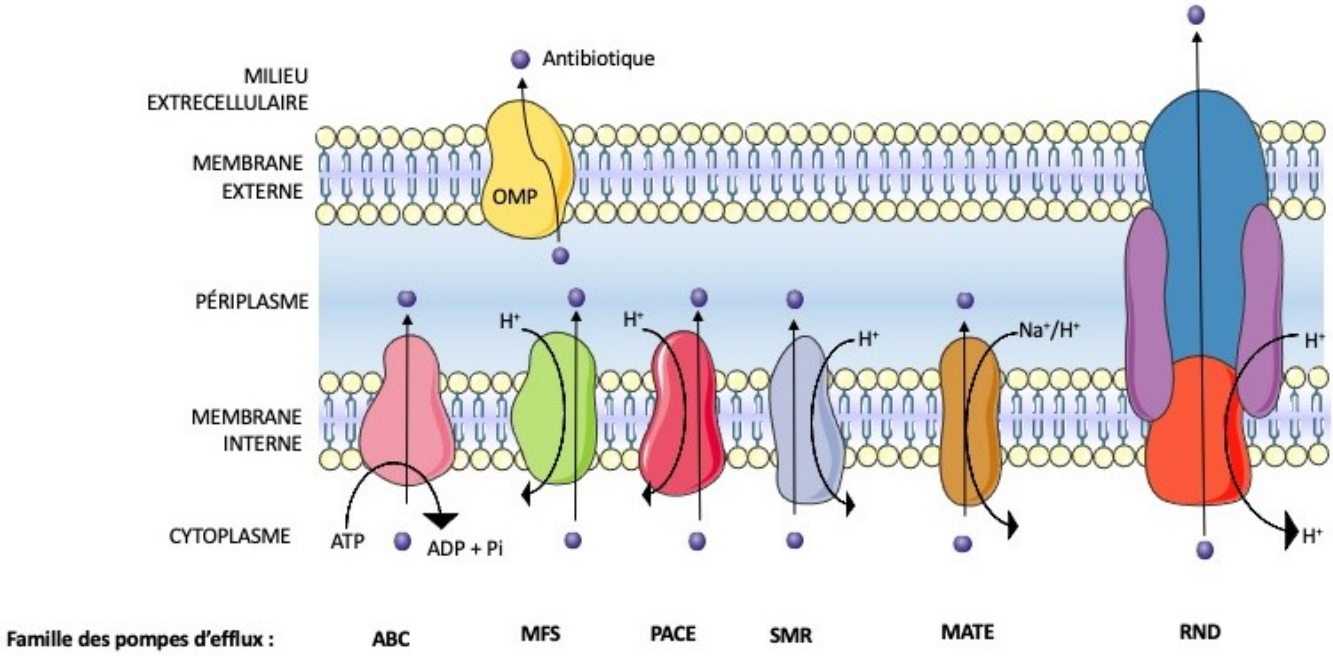


Figure 10. Schéma des différentes familles de pompes d'efflux – Adapté de (Blanco et al. 2016), Créé avec Servier Medical Art

Tableau 5. Pompes d'efflux ayant été décrites chez *A. baumannii* – Adapaté (Jordi Vila, Martí, et Sánchez-Céspedes 2007; Okada et al. 2017)

Nom	Famille	Actives contre
Tet (A)	MFS	Tétracycline
Tet(B)	MFS	Tétracycline et Minocycline
CmlA	MFS	Chloramphénicol
AdeABC	RND	Aminosides, ß-lactamines, Chloramphénicol, Erythromycine, Classe des tétracyclines et des fluoroquinolones
AbeM	MATE	Norfloxacine, Ofloxacine, Ciprofloxacine et Gentamicine
MacB	ABC	Macrolides

3. Les ß-lactamases

Les ß-lactamases sont des enzymes d'inactivation qui permettent aux bactéries de dégrader les ß-lactamines. Il existe différents types de ß-lactamases : les pénicillinases, les céphalosporinases, les ß-lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases (Annexe 1). Seules les céphalosporinases, les ß-lactamases à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases ont été identifiées chez *A. baumannii*. Ces enzymes sont codées par divers éléments génétiques mobiles.

a. Les céphalosporinases

Les céphalosporines, aussi appelées *Acinetobacter-derived cephalosporinases* (ADCs) sont produits par les souches d'*A. baumannii* possédant le gène *ampC* (G. Bou et Martínez-Beltrán 2000; Hujer et al. 2005; LIU et LIU 2015). Ce gène est très répandu chez *A. baumannii* : par exemple sur 134 souches cliniques collectées dans différents hôpitaux d'une région chinoise, 72% d'entre elles possédaient le gène *ampC* (LIU et LIU 2015). Tout comme chez *P. aeruginosa ou E. coli*, ce gène n'est pas inductible chez *A. baumannii* car exprimé de façon constitutive (Germán Bou et al. 2000; Héritier, Poirel, et Nordmann 2006; P. N. A. Harris et Ferguson 2012). En effet, chez *A. baumannii* le gène *ampC* est placé sous le contrôle d'une séquence d'insertion (*IS*) appelée *ISAba1* qui permet, via un promoteur fort, une surexpression de ce gène et donc

une résistance à large spectre aux céphalosporines (Corvec et al. 2003; Ruiz et al. 2007; Héritier, Poirel, et Nordmann 2006; Segal, Nelson, et Elisha 2004). Il est à noter que le céfépime et les carbapénèmes ne sont pas dégradés par les céphalosporinases (Hujer et al. 2005).

b. Les ß-lactamases à spectre étendu (BLSE)

D'autres gènes ont été identifiés chez *A. baumannii* codant pour des BLSE, tels que les gènes *Vietnamese extended-spectrum-ß-lactamase* (VEB), *Poirel Esthel Ronco* (PER), *Temoneria* (TEM), *Cefotaxime-Munchen* (CTX-M) et *Sulphydryl variable* (SHV). Ces BLSE ont été identifiées comme participant à la résistance aux pénicillines et aux céphalosporines de 3e génération chez des souches cliniques isolées dans divers pays (par ex : en France, en Roumanie ou en Argentine) (Carbonne et al. 2005; Naas et al. 2006; Pasterán et al. 2006; Laurent Poirel et al. 2003; Naas, Nordmann, et Heidt 2007; L. Poirel et al. 1999; Vahaboglu et al. 1997; Yong et al. 2003; Endimiani et al. 2007; Naiemi et al. 2005; Z. Huang et al. 2004; Celenza et al. 2006; Nagano et al. 2004; J. Vila et al. 1993; Danes et al. 2002).

c. Les oxacillinases

Les carbapénémases les plus communes et largement répandues dans le monde chez les souches d'*A. baumannii* sont les oxacillinases (OXA) 23, 24, 51 et 58 (C.-R. Lee et al. 2017). Par exemple, l'oxacillinase OXA-23, isolée pour la première fois en 1985 au Royaume-Uni à partir d'une souche clinique d'*A. baumannii* provenant d'une hémoculture, a été identifiée comme participant à la résistance à l'imipénème, à la pénicilline et aux céphalosporines de 1re génération (Paton et al. 1993). Le gène *blaOXA-23* codant pour cette carbapénémase a été ensuite largement disséminé dans le monde, et la fréquence de souches possédant ce gène a largement augmenté depuis. Par exemple, en 2016 au Liban, sur les 119 des souches cliniques d'*A. baumannii* isolées, 76,5% d'entre elles possédaient le gène *blaOXA-23* (Al Atrouni et al. 2016).

d. Les Métallo-ß-lactamases (MBL)

La résistance aux carbapénèmes causée par les métallo-ß-lactamases (MBL) est considérée comme plus grave que les autres mécanismes de résistance, car les MBL peuvent hydrolyser presque tous les ß-lactamines, à l'exception des monobactames (Fallah et al. 2014).

De plus, les gènes codant pour les MBL, étant codés par des intégrons ou des plasmides, peuvent se disséminer facilement d'une bactérie à l'autre. Les MBL ayant été identifiées chez *A. baumannii* sont les imipénémases (IMP), les *São Paulo metallo-ß-lactamases* (SPM), les *Verona intregon-encoded metallo-ß-lactamases* (VIM), les *New Delhi metallo-ß-lactamase* (NDM), les *Seoul imipenemases* (SIM), *Kyorin Unniversity Hospial imipenemase* (KHM), les *German imipenemases* (GIM) et les *Australian imipenemases* (AIM) (Fallah et al. 2014).

Depuis leur découverte, les souches produisant ces enzymes se sont disséminées dans le monde entier. Par exemple, la première ß-lactamase de type VIM a été découverte dans les années 1990 en Italie, et depuis on compte au moins 33 allotypes décrit et identifiées dans différentes régions du globe (Fallah et al. 2014).

Les souches exprimant des MBL de type NDM sont résistantes à presque toutes les classes d'antibiotiques (fluoroquinolones, aminoside, ß-lactamines (surtout les carbapénèmes)), mais sont sensibles aux polymyxines et parfois aux tétracyclines. Le gène codant pour l'enzyme NDM-1 a été détecté sur différents plasmides de grande taille, facilement transférables entre bactéries. Les souches produisant cette enzyme constituent donc une menace sérieuse pour la santé publique à l'échelle mondiale à cause de leur multirésitance. Cette ß-lactamase a été identifiée pour la première fois chez une souche de *P. aeruginosa* et une autre d'*E. coli* prélevées chez un patient suédois après son admission dans un hôpital à New Delhi. Ce gène a été ensuite identifié chez d'autres souches cliniques en France, au Canada, en Suède, en Australie, en Afrique, etc… (Fallah et al. 2014)

IV. Traitements des infections à *A. baumannii*

Il n'existe pas d'études visant à développer des antibiotiques spécifiquement pour *A. baumannii* (Theuretzbacher et al. 2019). Ainsi, **les stratégies thérapeutiques sont limitées et les traitements sont administrés aux patients de façon empirique** (D. Wong et al. 2017). Cependant, malgré le peu de recommandations, pour faciliter la compréhension des

traitements utilisés en clinique dans le cas d'infections à *A. baumannii,* un arbre de décision concernant la démarche thérapeutique (Figure 11) a été réalisé en se basant sur les recherches bibliographiques.

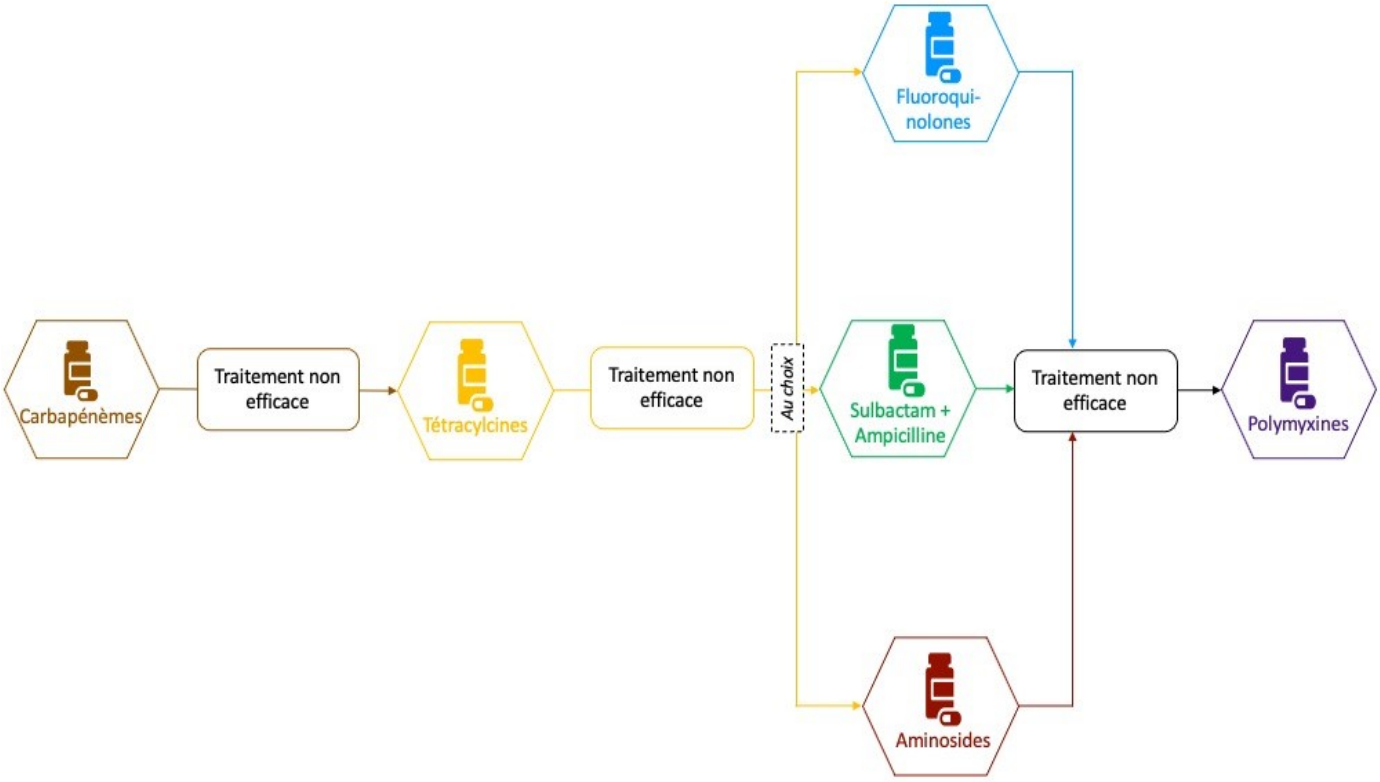


Figure 11. Arbre de décision de la démarche thérapeutique face aux infections dues à *A. baumannii*

Face aux infections causées par *A. baumannii* le traitement de première intention est une antibiothérapie aux carbapénèmes (D. Wong et al. 2017). Le méropénème est l'antibiotique de cette classe le plus adéquat, car cette molécule est peu affine avec certaines oxacillinases. De plus, sa stabilité en perfusion prolongée ainsi que sa plus faible toxicité en font un meilleur candidat que l'imipénème (Queenan et Bush 2007). Cette stratégie est particulièrement efficace dans le cas d'infections causées par des souches sensibles (CMI < 2 mg/L) ou intermédiaires (2 < CMI < 8mg/L). En effet, l'index PK/PD utilisé pour les ß-lactamines est le temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont supérieures à la CMI ($T_{>CMI}$). Ainsi, lorsque la CMI des souches cliniques est élevée (> 8 mg/L), cela diminue la probabilité d'atteindre l'index PK/PD nécessaire avec une posologie usuelle de 1 g toutes les 8 h. Pour pallier ce problème, Lomaestro et Drusano ont proposé l'utilisation d'une perfusion prolongée de 2 g toutes les 8 h (Lomaestro et Drusano 2005). Ainsi, face aux infections causées par des

souches d'*A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes (CRAB), c'est-à-dire présentant une la CMI supérieure à 32 mg/L, l'utilisation d'autres classes d'antibiotiques est nécessaire.

Deux antibiotiques de la classe des cyclines peuvent être utilisés pour les infections causées par des CRAB. Dans un premier temps, la tigécycline est souvent utilisée (D. Wong et al. 2017). Elle est administrée par voie intraveineuse avec une dose initiale à 100 mg, suivie de doses répétées de 50 mg toutes les 12 h. Or, les concentrations plasmatiques de la tigécycline sont très basses (C_{max} <0.87 mg/L) en raison d'un volume de distribution important (7-10 L/kg) (Meagher et al. 2005). Dans une étude de cohorte, il a été montré les traitements des infections à la tigécycline conduisent à une plus faible survie des patients est due à une incapacité à éradiquer l'infection pulmonaire et conduit donc au développement d'une infection plus virulente (Chuang et al. 2014). Ainsi en cas de résistance à la tigécycline, la minocycline peut être utilisée comme alternative. Une étude *in vitro* a montré que la minocycline était la cycline la plus active contre *A. baumannii*. En mesurant la CMI de différents antibiotiques dont la minocycline des contre souches cliniques d'*A. baumannii* provenant de différentes régions du monde (Etats-Unis d'Amérique, Europe, Amérique du sud, Asie, et région méditranéenne) il a été montré que 81,6% de ces souches étaient multirésistantes mais présentaient une sensibilité à la minocycline (CMI ≤ 4mg/L selon le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)) (Flamm et al. 2016).

Le sulbactam combiné à l'ampicilline est une alternative aux tétracyclines utilisé uniquement aux Etats-Unis d'Amérique (Betrosian et al. 2007). Le sulbactam est un inhibiteur des pénicillinases qui peut également avoir un effet antibactérien direct sur certains pathogènes tels qu'*A. baumannii* (Penwell et al. 2015). En effet, Penwell *et al.* ont testé l'efficacité du sulbactam, et il en résulte que même sans ampicilline, le sulbactam avait une activité bactéricide sur certaines des souches cliniques d'*A. baumannii* testée, avec des CMI allant de 0,5 à plus de 64 mg/L ; alors que la combinaison ampicilline/sulbactam (avec un ratio de 2:1) était deux fois moins active (Penwell et al. 2015). Le sulbactam exerce son effet bactéricidie selon un mode d'action similaire à celui des ß-lactamines, puisqu'il se fixe aux PLP1 et PLP3 (Penwell et al. 2015). Toutefois, des résistances au sulbactam commencent à émerger (« Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2018 » 2019; Jones et al. 2014). En effet, une résistance accrue au sulbactam est associée à des mutations du gène *plp3*, tandis qu'une

faible résistance à cette molécule est due à des mutation des gènes de la synthèse de la paroi bactérienne et de la réponse au stress.

Les fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine, la lévofloxacine et l'acide nalidixique, peuvent être également utilisées pour les traitements des infections à *A. baumannii* (Warner et al. 2016). Cependant, des résistances ont été très rapidement observées. Des mutations spontanées au sein des gènes *gyrA*, *gyrB* et/ou *parC* rendent les souches d'*A. baumannii* fortement résistantes à la ciprofloxacine et à l'acide nalidixique (Liu et al. 2012). Ces gènes (*gyrA, gyrB* et *parC*) codent respectivement pour les sous-unités A et B de l'ADN gyrase et la sous-unité C de la toposisomérase IV qui sont des éléments essentiels à la réplication et la transcription de l'ADN et donc à la survie d'*A. baumannii*. Les fluroquinolones formant un complexe ternaire avec l'ADN et la protéine GyrA ou ParC, bloquent ainsi la transcription ou la réplication. À la suite des mutations des gènes *gyrA, gyrB* et *parC*, les protéines néosynthétisées sont modifiées et les fluoroquinolones ne peuvent plus les reconnaitre (Liu et al. 2012; Ardebili et al. 2015). Les pompes d'efflux AdeABC, AdeM ont été également identifiées dans la résistance aux fluoroquinolones chez *A. baumannii* (Park et al. 2011)(Park et al. 2011).

Les aminosides, comme la gentamicine et la tobramycine, sont aussi l'un des traitements utilisés comme alternative aux tétracyclines (Akers et al. 2010). Toutefois, des résistances médiées par des enzymes de modification des aminosides, telles que les acétyltransférases, nucléotidyltransférases, et les phosphotransférases, mais aussi par des pompes d'efflux AdeABC, AdeM et la méthylation de l'ARN ribosomale 16S ont été observées (Akers et al. 2010; Magnet, Courvalin, et Lambert 2001).

Ainsi, compte tenu des limites de la plupart des antibiothérapies, les polymixines sont de plus en plus utilisés dans de nombreuses régions du monde comme traitement de dernier recours pour faire face aux infections causées par des souches multirésistantes d'*A. baumannii*.

Chapitre 2 : La polymyxine B, un traitement de dernier recours

I. Structure chimique

Les polymyxines font partie de la famille des antibiotiques **polypeptidiques**. Ces antibiotiques sont des **molécules cycliques amphipatiques** grâce leur acyle gras, relié par un tripeptide à une boucle intramoléculaire cyclique composée de 7 acides aminés (Figure 12). Ils se différencient entre eux par leur acyle gras et les acides aminés en position 3, 6, 7 et 10 (Figure 12). Les résidus d'acide L-α,γ-diaminobutyrique (L-Dab) leur confèrent une **charge globale positive**.

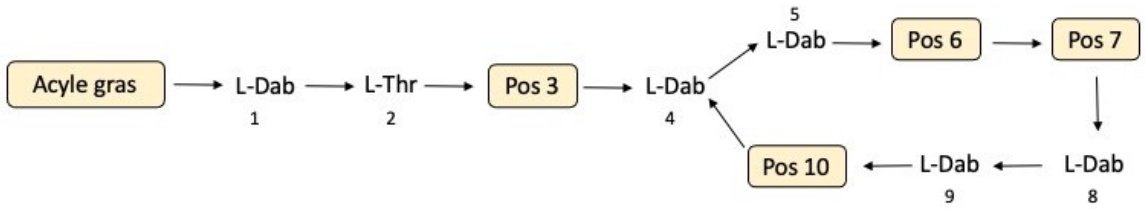


Figure 12. Structure des polymyxines classe des polypeptides

Les antibiotiques de cette classe les plus couramment utilisés en clinique sont la colistine (CST), ou polymyxine E, et la polymyxine B (PMB). Ces deux antibiotiques se diffèrent entre eux par l'acide aminé en position 6. La D-phénylalanine retrouvée dans la PMB est remplacée par une D-Leucine dans la CST (Tableau 6).

Tableau 6. Composition chimique de la polymyxine B et de la colistine

Polymyxines		Groupements				
		Acyle Gras	**Position 3**	**Position 6**	**Position 7**	**Position 10**
Polymyxine B	**B1**	(*S*)-6-methyloctanoyl	L-Dab	D-Phe	L-Leu	L-Thr
	B2	6-methylheptanoyl	L-Dab	D-Phe	L-Leu	L-Thr
Colistine	**E1**	(*S*)-6-methyloctanoyl	L-Dab	D-Leu	L-Leu	L-Thr
	E2	6-methylheptanoyl	L-Dab	D-Leu	L-Leu	L-Thr

Note : L-Dab = Acide L-α,γ-diaminobutyrique, D-Phe = D-Phénylalanine, D-Leu = D-Leucine, L-Leu = L-Leucine et L-Thr = L-Thréonine

Par ailleurs, la PMB, comme la CST, est commercialisée sous la forme d'un mélange de plusieurs composants (PMB B1, B2, B3 et B1-I), les formes B1 et B2 étant majoritaires, représentant respectivement 48% et 22% de la PMB commercialisée (Orwa et al. 2002) (Figure 13).

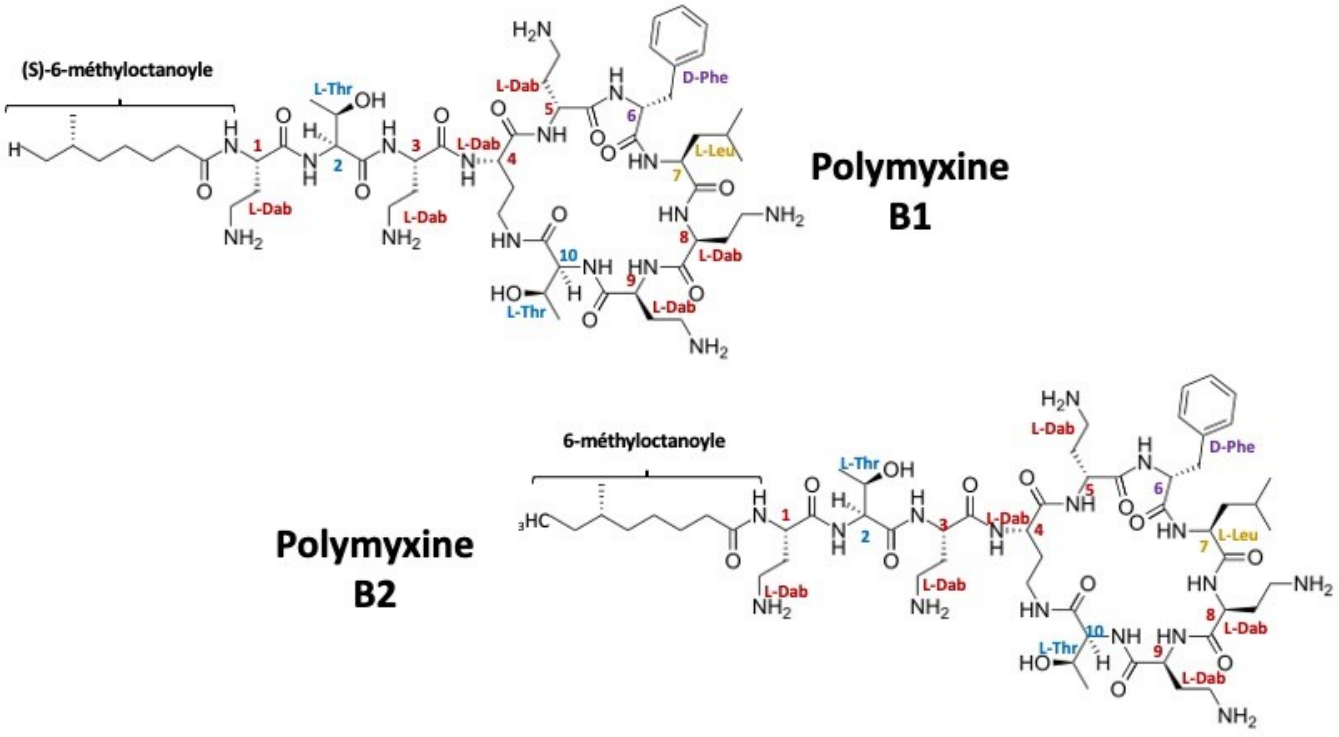


Figure 13. Structures chimiques des polymyxines B1 (*en haut*) et B2 (*en bas)*

II. Mode d'action de la polymyxine B

Étant donné leurs similarités structurelles, la CST et la PMB ont un spectre antimicrobien commun. Ces molécules sont inefficaces contre les BGP, seules les BGN du genre *Neisseria*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Brucella* et *Edwardsiella* y sont non sensibles (Cai, Lee, et Kwa 2015; Olaitan, Morand, et Rolain 2014; Collège national de pharmacologie médicale et Société française de pharmacologie et de thérapeutique 2018). Elles ont un effet bactéricide contre la majorité des pathogènes Gram négatifs couramment responsables d'infections nosocomiales, tels que *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae, E. coli* et *A. baumannii* (Sabnis et al. 2021).

La PMB interagit majoritairement avec le lipide A du LOS, mais elle peut aussi se fixer sur les phospholipides de la membrane externe. Le lipede A et les phospholipides étant chargés négativement, la PMB se lie à eux par une liaison électrostatique (Figure 14). Cette liaison provoque le déplacement d'ions divalents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) présents au niveau des groupements phosphates des lipides membranaires reliant les molécules de LOS. La queue hydrophobe et les groupements D-Phe et L-Leu (en position 6 et 7) de la PMB peuvent alors s'insérer au

niveau des chaines d'acyle gras du lipide A et ainsi perturber leur tassement. Les LOS vont alors se détacher de la surface de la membrane externe et l'introduction de la PMB dans le feuillet externe conduit à la formation de pores dans celui-ci. La PMB peut alors pénétrer dans le périplasme (J. Li, Nation, et Kaye 2019).

Une fois au niveau périplasmique, la PMB peut induire une lyse cellulaire en se fixant aux LOS situés sur le versant périplasmique de la membrane interne qui attendent d'être transportés vers la membrane externe par le complexe protéique LptABCDEFG (Figure 14) (Sabnis et al. 2021). La PMB, une fois fixée, peut insérer sa queue lipidique dans la membrane interne et créer, tout comme dans la membrane externe, des pores. Une fuite du contenu cellulaire est alors observée (Figure 14) (Deris et al. 2014; Sabnis et al. 2021). Deris et son équipe ont également démontré que la PMB pouvait induire une mort cellulaire en inhibant de façon non compétitive l'enzyme NDH-2 de la chaine respiratoire (Figure 14) (Deris et al. 2014).

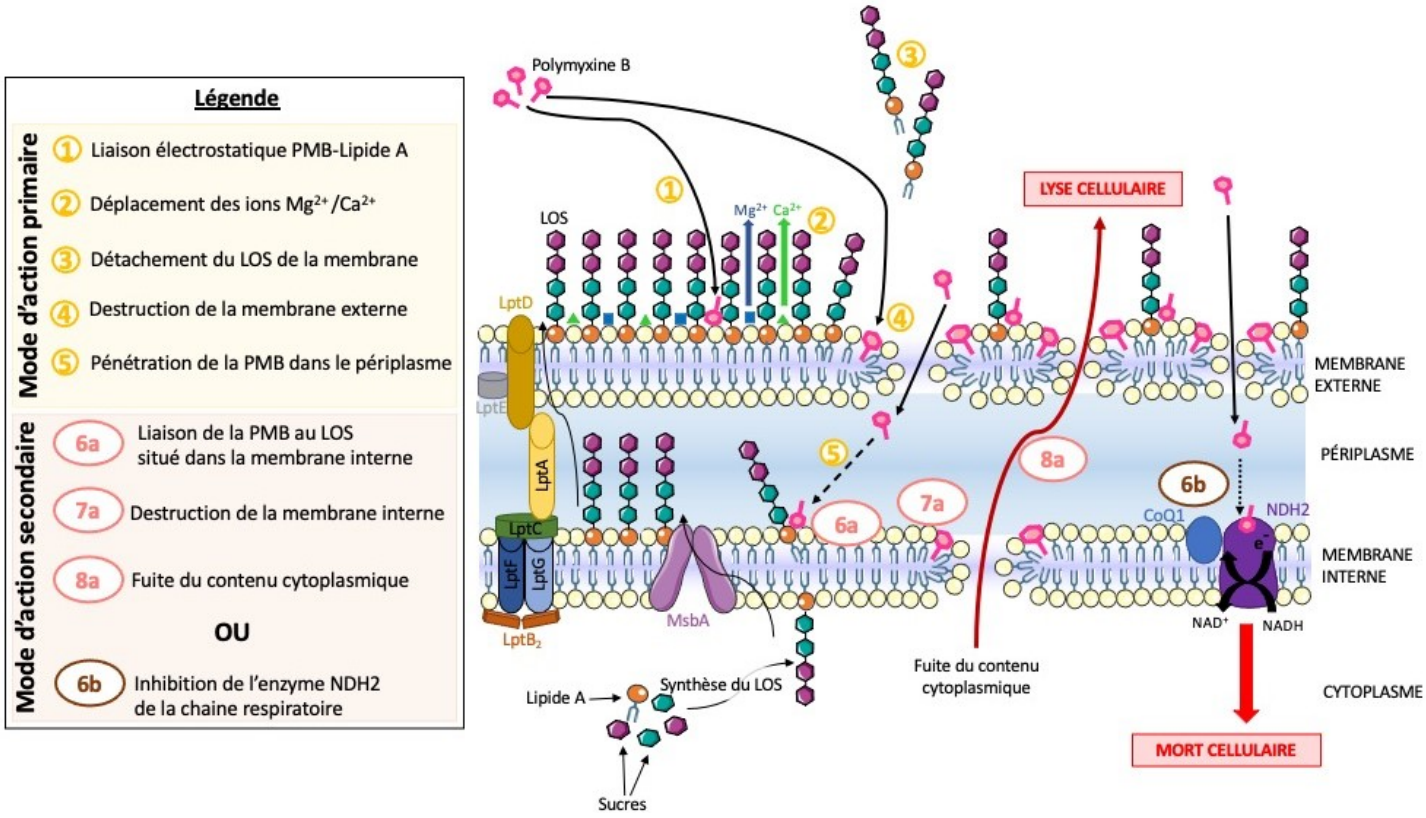


Figure 14. Mode d'action de la polymyxine B sur les bactéries à Gram négatif – Adapté (Deris et al. 2014; Sabnis et al. 2021), Créé avec Servier Medeical Art

III. Utilisations en clinique

A. Préparation et administration de la polymyxine B

Contrairement à la **CST, qui est administrée sous la forme d'un promédicament inactif**, le colistine méthanesulfonate (CMS), la **PMB est administrée sous sa forme active**, le sulfate de PMB.

La CST (sous forme de CMS) est utilisée en Europe, Australie, Afrique du Sud et au Japon, alors que la PMB n'est utilisée qu'aux États-Unis d'Amérique, au Brésil, en Malaisie et à Singapour. En effet, lors de réapparition des polymyxines, le CMS a été préféré à la PMB en raison d'une hypothétique sûreté du CMS en termes de toxicité. La PMB est principalement utilisée pour une voie intraveineuse (Falagas et al. 2021), mais elle peut être administrée par voie intramusculaire, intraveineuse, inhalée, intratrachéale, et topique (par exemple : solution ophtalmique, solution otique, solution d'irrigation, pommade ou poudre) (A. Kwa et al. 2007).

B. PK/PD de la polymyxine B

1. Pharmacocinétique de la polymyxine B

Malgré le peu d'études cliniques disponibles sur la pharmacocinétique (PK) de la PMB, il a été démontré à l'aide d'une étude chez des patients adultes (≥ 16 ans) présentant des infections (brûlures, infections des tissus mous, infection urinaire ou bactériémie) à BGN multirésistantes (*A. baumannii* et *P. aeruginosa*), que la PMB B1 (composant majoritaire) a un volume de distribution de 47,2 L proche du volume d'eau totale de l'organisme et une demi-vie ($t_{1/2}$) de 13,6 h (A. L. H. Kwa et al. 2008). Une autre étude, menée par Zavaski *et al.* a permis de montrer que la concentration maximale (C_{max}) de la PMB était atteinte à la fin de la perfusion. De plus, il a démontré que la PMB était une molécule fortement liée aux protéines plasmatiques, puisque 78,5 à 92,4 % de la dose administrée était fixée (Zavascki et al. 2008). Chez les patients présentant une infection aiguë, la fixation protéique peut être plus importante en raison de la fixation de la PMB à l'α-glycoprotéine 1, un marqueur typique de la phase aiguë de l'inflammation qui est plus fortement exprimé à ce stade de l'infection (Azad et al. 2012; Zavascki et al. 2008). La faible variation de la clairance totale de la PMB (0,27-0,81 mL /min/kg) chez les 8 patients placées en soins intensifs et présentant une PAVM à *P. aeruginosa* ou *A. baumannii* de l'étude ayant des fonctions rénales très différentes, indique

que la PMB est éliminée majoritairement par voies non rénales (Zavascki et al. 2008). Une seconde étude a confirmé ces résultats, et a montré qu'une faible proportion de la PMB (4,04%) est excrétée sous forme inchangée dans les urines (Sandri et al. 2013).

Ainsi, **la PMB étant administrée directement sous une forme active, a une PK est plus simple que celle de la CST**, comme illustrée sur laFigure 15. En effet, en raison de la lente conversion du CMS en CST, la C_{max} plasmatique de la colistine est décalée dans le temps par rapport à celle du CMS. Plachouras *et al.* ont montré que le C_{max} plasmatique de la CST est atteinte seulement 7 h après le début de la perfusion de CMS (Plachouras et al. 2009). De plus, chez les patients dont la fonction rénale est normale (Clairance de la créatinine (Cl_{cr}) = 80-120 mL/min), seuls 30% de la dose de CMS administrée est convertie en CST, et 64% du CMS inchangé sont excrétés dans les urines. La CST est majoritairement éliminée par des voies non rénales (Couet et al. 2011; Garonzik et al. 2011). La rapide clairance rénale du CMS en lien avec une faible vitesse de conversion du CMS en CST, implique que le CMS est excrété de manière importante par voie rénale avant d'être transformée en CST (2/3 de la dose) (Couet et al. 2011). Cependant, contrairement à la PMB, la fonction rénale impacte la PK de CMS et par conséquent celle de la CST. Chez les patients dont les fonctions rénales sont altérées (Cl_{cr} < 80 L/min), la clairance du CMS par voie rénale diminue ayant pour conséquence une augmentation des concentrations en CST, puisqu'une plus grande proportion de CMS peut être convertie en CST chez ces patients (Garonzik et al. 2011).

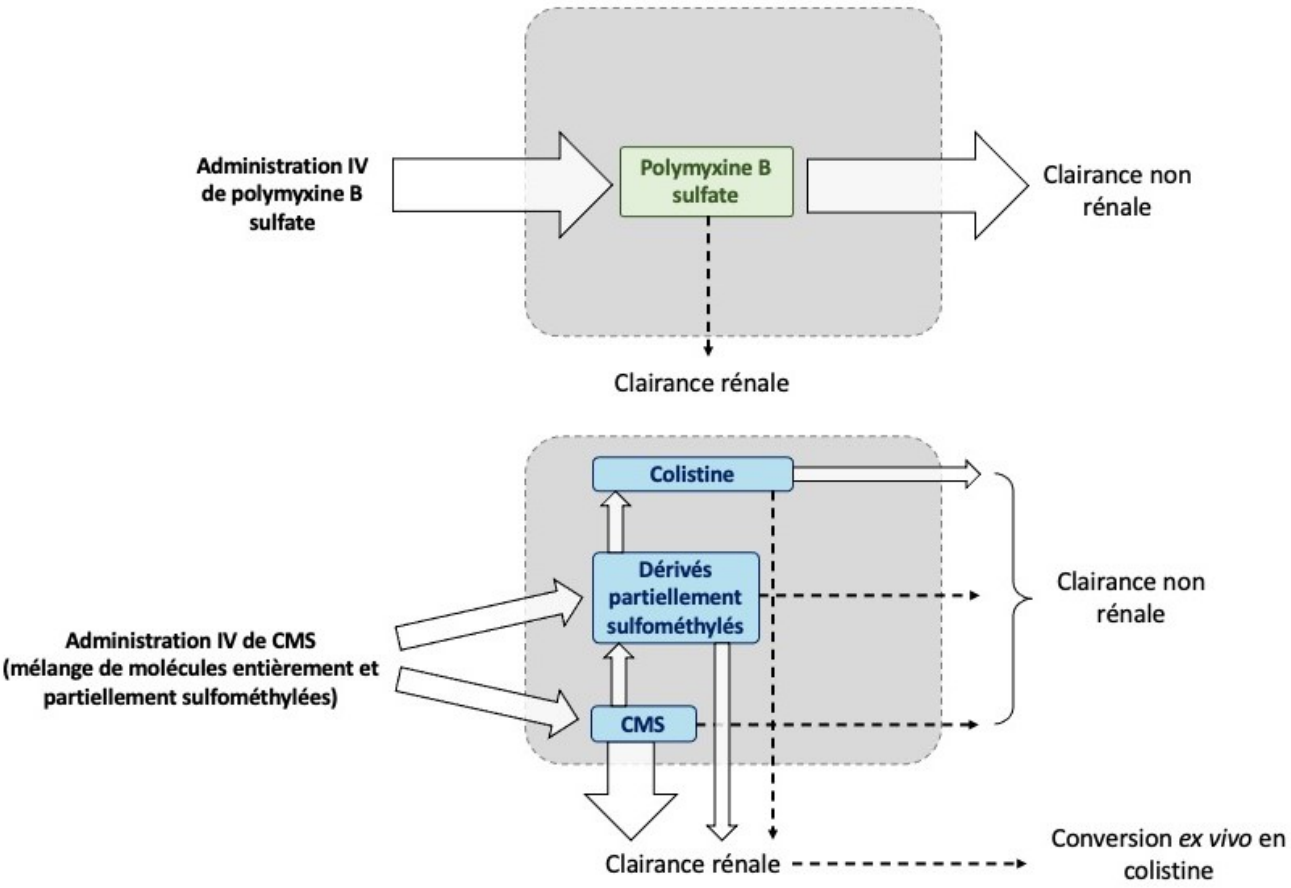


Figure 15. Schéma de la pharmacocinétique de la PMB (en haut) et du CMS (en bas) *in vivo* après administration par voie intraveineuse. Les rectangles grisés représentent les compartiments *in vivo*. Les flèches blanches représentent les étapes majoritaires. Les flèches noires en pointillés représentent les étapes minoritaires – Traduit de (Cai, Lee, and Kwa 2015)

2. Pharmacodynamie de la polymyxine B

Quelle que soit l'étude considérée, la CST et la PMB montre un **effet bactéricide rapide concentration dépendant** lors d'étude d'efficacité *in vitro* de *time-kill curves* (TKC) (cf Chapitre 3 : De multiples méthodes d'évaluation de l'efficacité des antibiotiques) ou *in vivo* dans des modèles animaux infectieux à *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (Y.-W. Lin et al. 2018; Bulitta et al. 2010; Tam et al. 2005). Toutefois, *in vitro* lorsque les souches d'*A. baumannii* et *K. pneumoniae* étaient sensibles (CMI ≤ 2 mg/L), une rapide décroissance suivie d'une repousse à 6h était observée ; ce phénomène de repousse étant souvent attribué à une hétérorésistance (J. Lin et al. 2019; Hermes et al. 2013; Cheong et al. 2019; Genteluci et al. 2020), qui est définie comme la présence d'une petite sous-population bactérienne résistante

alors que la souche a été identifiée comme étant sensible à un antibiotique (Genteluci et al. 2020).

Comme de nombreux antibiotiques cationiques, **les polymyxines sont moins actives sur les biofilms bactériens que sur les bactéries planctoniques** (Lima et al. 2019; Peng, Lin, et Ling 2020). Lors d'une étude *in vitro,* l'efficacité de combinaisons d'antibiotiques comprenant de la PMB avec des antibiotiques (rifampicine et azithromycine) ayant pour effet d'inhiber la formation de biofilms a été testée sur la formation de biofilms de 9 souches cliniques multirésistantes d'*A. baumannii.* Ces souches ont été isolées à partir de divers échantillons cliniques (expectoration, aspiration endotrachéale ou liquide de lavage respiratoire) prélevés chez des patients issus des services de soins intensifs, de gériatrie, de médecine interne et d'urgence. Il en résulte que seules les combinaisons rifampicine/polymyxine B et azithromycine/polymyxine B étaient synergiques, alors que la PMB seule n'avait aucun effet. Ce qui montre que la PMB pénètre difficilement au sein des biofilms (Peng, Lin, et Ling 2020).

3. Indications de la polymyxine B

Tout comme la CST, la PMB est utilisée pour les traitements d'infections causées par des bactéries Gram négatif multirésistantes. Cependant, lorsque les deux polymyxines sont disponibles, en raison de leur PK différente, il est recommandé d'utiliser la PMB dans le cas d'infections invasives par voie intraveineuse ; la CST est plutôt indiquée pour le traitement d'infections urinaires inférieures.

Ces antibiotiques étant toxiques, les doses prescrites aux patients sont limitées. La néphrotoxicité et neurotoxicité sont les toxicités les plus importantes ayant été décrites avec les polymyxines. D'autres effets indésirables moins fréquents ont été également observés. En effet, une douleur lors de l'injection intramusculaire, des réactions d'hypersensibilité médiées par l'histamine (urticaire, prurit, fièvre médicamenteuse), ou encore le développement de bronchospasmes lors de l'administration par aérosol ont été décrits (Tsuji et al. 2019).

IV. Mécanismes de résistance aux polymyxines B chez *A. baumannii*

Certaines souches d'*A. baumannii* ont été identifiées comme étant résistantes aux polymyxines (López-Rojas et al. 2011; Moffatt et al. 2010; 2011; Trebosc et al. 2019; Cafiso et al. 2019; Lesho et al. 2013). L'apparition de mutants résistants peut être observée en cours de traitement (López-Rojas et al. 2011; Cafiso et al. 2019). Par exemple, une souche d'*A. baumannii* résistante à la CST a été isolée à partir du liquide céphalo-rachidien d'un patient atteint d'une méninge à *A. baumannii* 9 j après le début du traitement, cette souche étant isogénique de la souche sensible identifiée avant la mise en place du traitement (López-Rojas et al. 2011).

Deux mécanismes ont été décrits chez *A. baumannii* comme étant impliqués dans l'adaptation des bactéries aux polymyxines. Certaines souches vont modifier le lipide A du LOS, et d'autres vont arrêter la synthèse du lipide A et donc du LOS (Trebosc et al. 2019; Beceiro et al. 2011; Lesho et al. 2013; Adams et al. 2009; Moffatt et al. 2010).

A. Modification du lipide A du lipooligosaccharide

1. Ajout d'un groupement PEtN médié par le système PmrA-PmrB

Chez *A. baumannii*, **le lipide A peut être modifié par l'ajout d'un groupement phospho-éthanolamine (PEtN) via le système à double composante PmrA-PmrB** (Figure 16) Sans antibiotique, en réponse à une faible concentration de Mg^{2+}, PmrB, une kinase senseur localisée au niveau de la membrane interne, phosphoryle le régulateur de transcription PmrA (Beceiro et al. 2011). Ensuite, PmrA phosphorylée active la transcription de l'opéron *pmrCAB* et active ainsi l'expression du gène *pmrC* qui code pour une PetN transférase (Trebosc et al. 2019). Cette PEtN transférase, une fois synthétisée, est adressée à la membrane interne, où elle ajoute un groupement PEtN au lipide A du LOS situé sur le versant périplasmique de la membrane interne avant son exportation vers la membrane externe. **Ce groupement PEtN neutralise alors la charge nette du lipide A** (Beceiro et al. 2011; Trebosc et al. 2019).

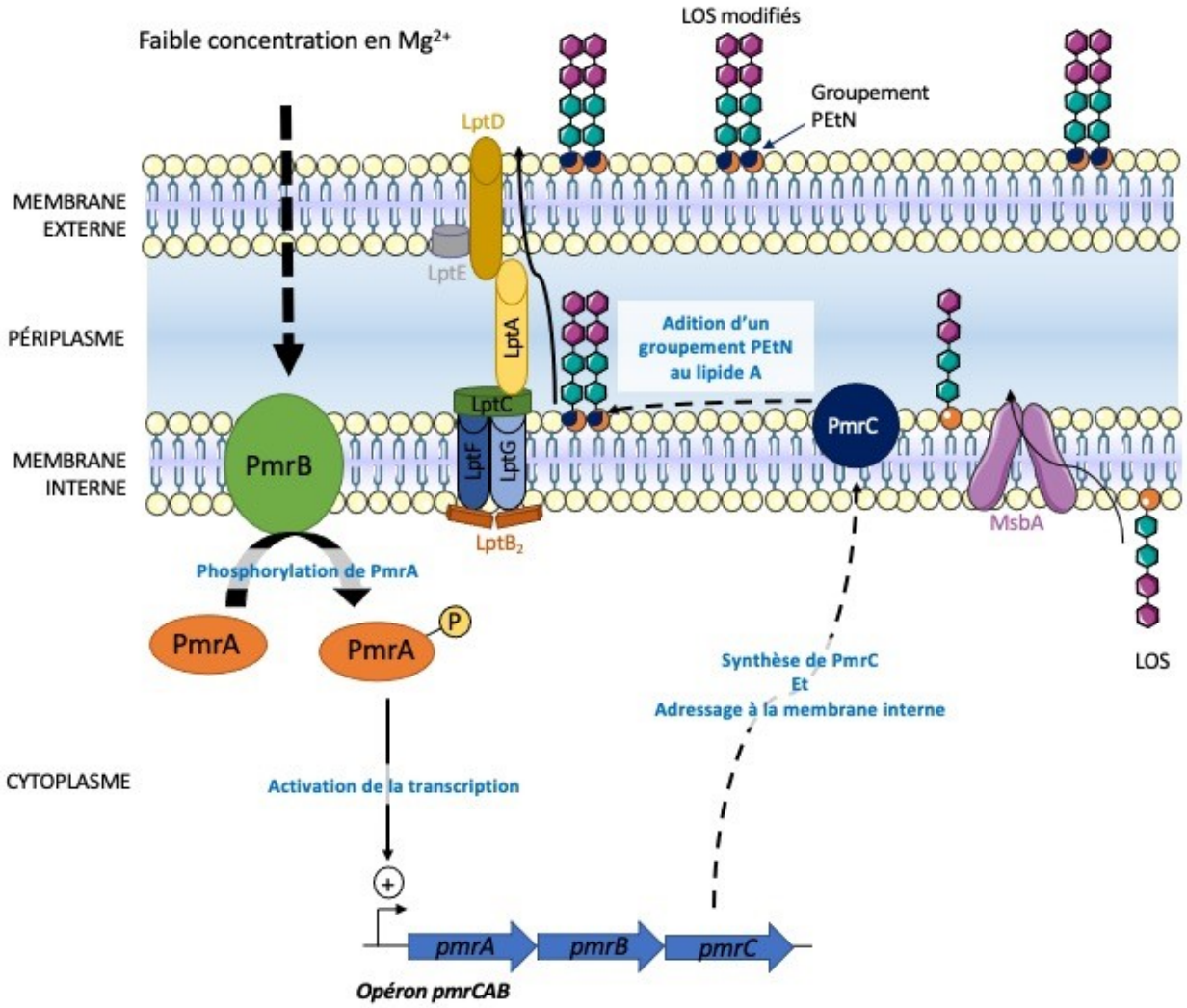


Figure 16. Modification de lipide A du LOS en réponse à une faible concentration de Mg^{2+} - Créé avec Servier Medical Art

En présence de PMB, des mécanismes similaires sont observés. En effet, des **mutations au sein du gène *pmrB*** sont produites conduisant à une activation constitutive de la kinase PmrB, et donc à une surexpression des gènes *pmrA* et *pmrC* (Figure 17) (Trebosc et al. 2019; Beceiro et al. 2011). Adam *et al.*, ont également montré qu'une surexpression de *pmrC* pouvait être également causée par des **mutations au sein du gène *pmrA*** (Figure 18). La surexpression de l'opéron *pmrCAB* est alors constitutive (Adams et al. 2009). **Le groupement PetN neutralisant les charges négatives des groupes phosphates du lipide A, il empêche alors la PMB d'interagir avec le lipide A du LOS**.

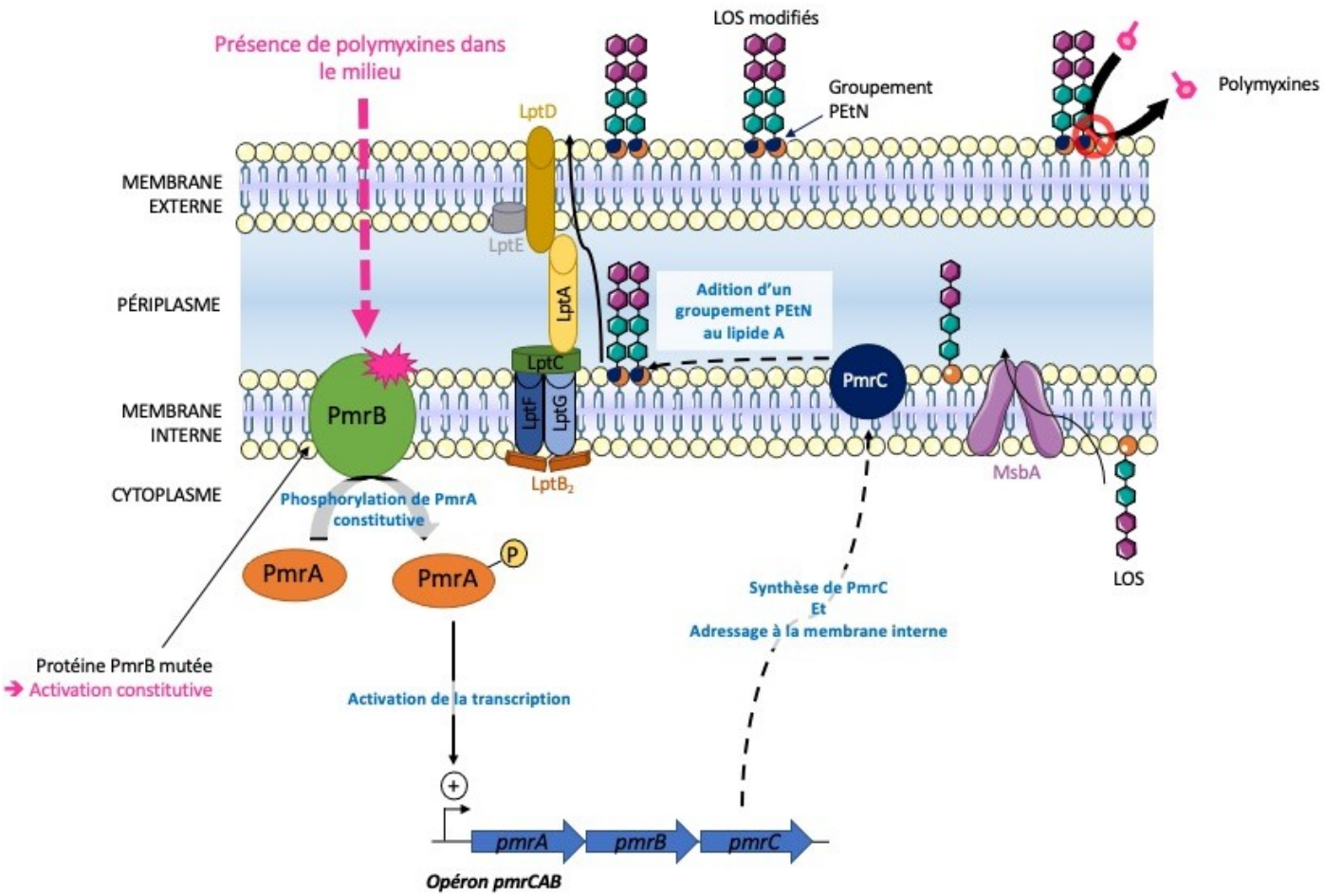


Figure 17. Modification du lipide A en réponse aux polymyxines à la suite de mutations du gène *PmrB* – Créé avec Servier Medical Art

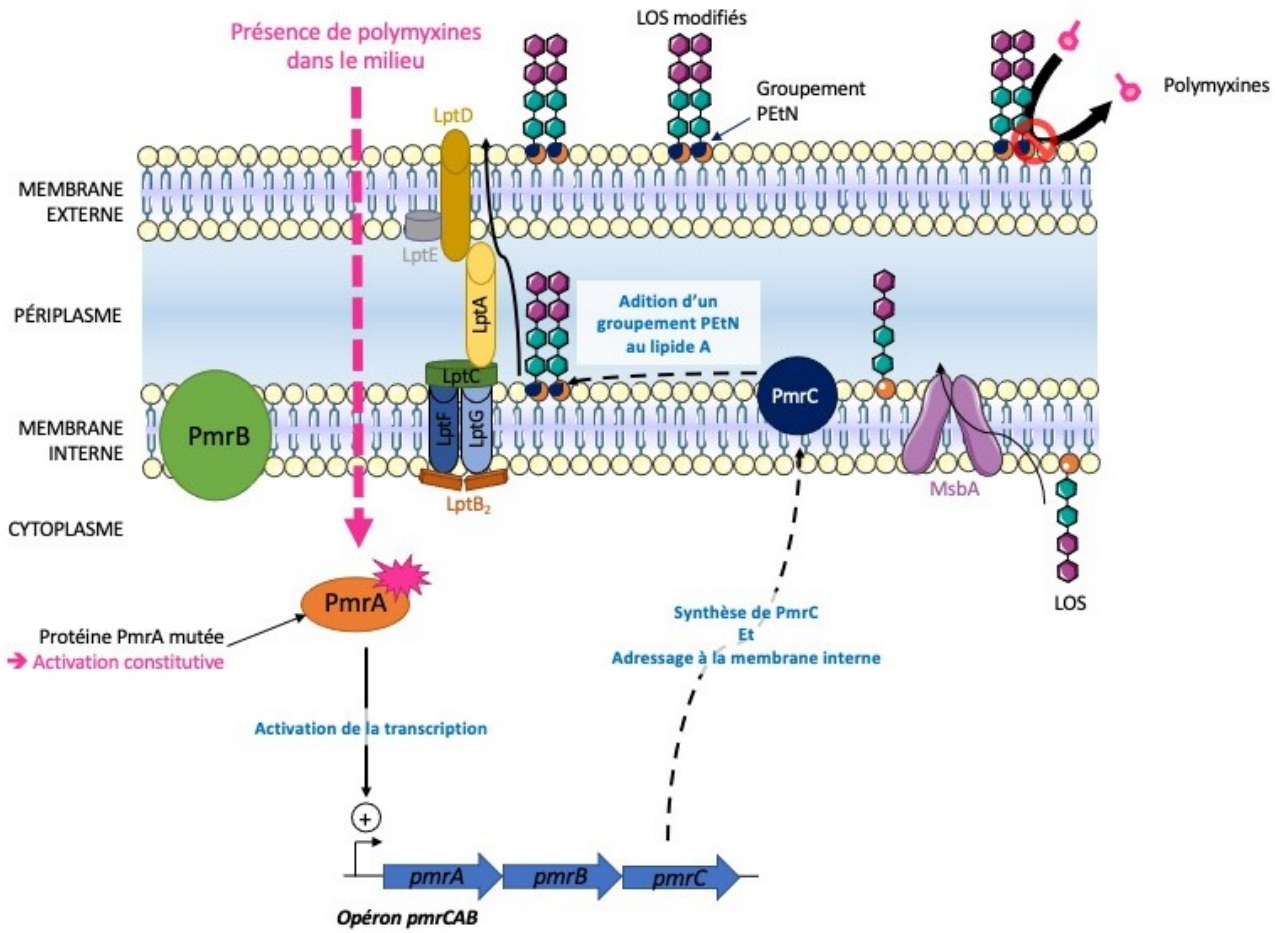


Figure 18. Modification du lipide A en réponse aux polymyxines à la suite de mutations du gène *PmrA* – Créé avec Servier Medical Art

2. Ajout d'un groupement PEtN médié par une protéine homologue de PmrC, EptA

Un **mécanisme alternatif à la surexpression de *pmrC*** a été décrit chez certaines souches d'*A. baumannii* cliniques résistantes à la PMB isolées à partir de brûlures, prélèvements urinaires et pulmonaires (Lesho et al. 2013). **Ce mécanisme alternatif est régulé par la phospho-éthanolamine transférase EptA** (Figure 19). En effet, Trebosc *et al.*, ont montré que, chez certaines souches cliniques résistantes à la PMB, l'intégration de la séquence d'insertion (IS) *ISAba*1 en amont de toute isoforme du gène *eptA* (codant pour la phospho-éthanolamine transférase EptA), induisant une surexpression de celui-ci, est nécessaire à l'obtention du phénotype de résistance (Trebosc et al. 2019; Lesho et al. 2013).

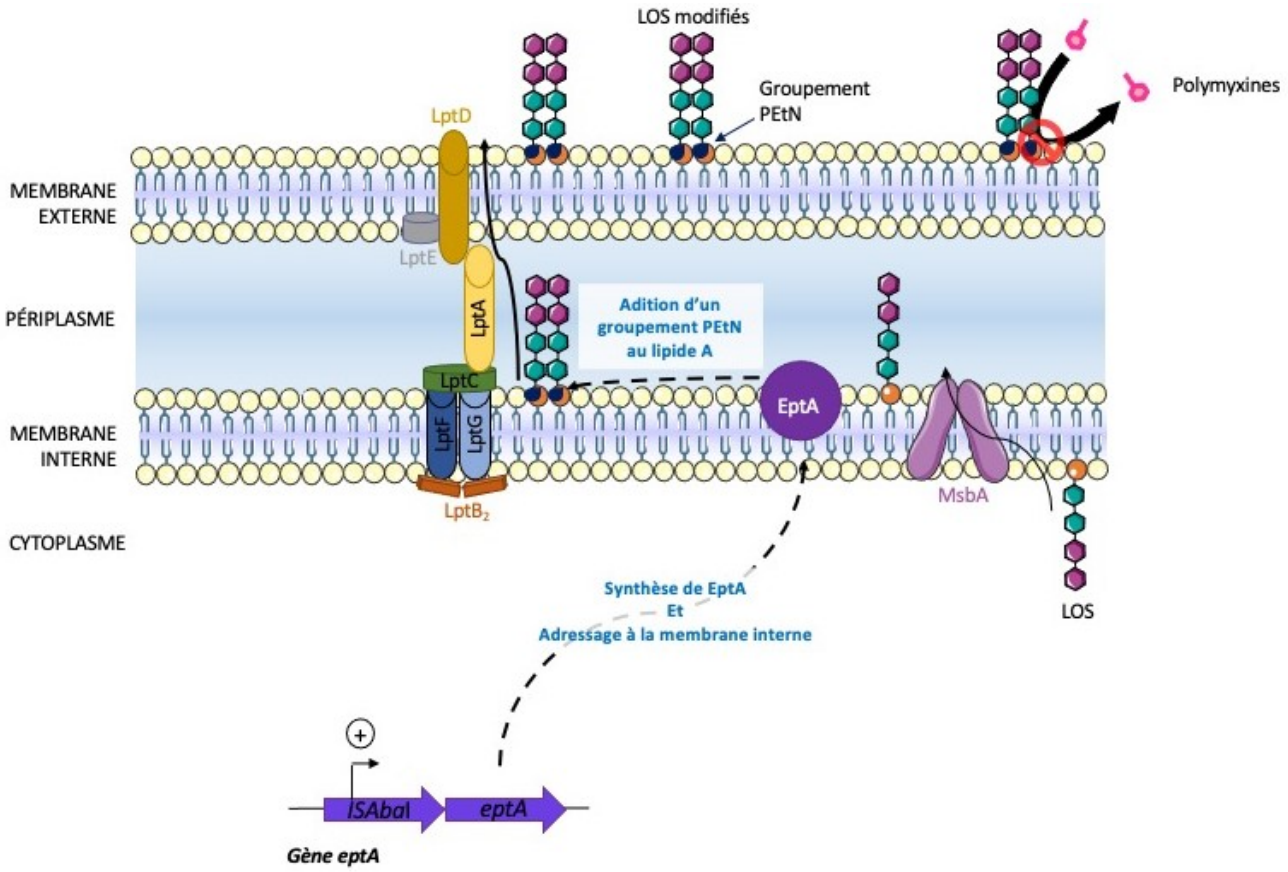


Figure 19. Modification du lipide A à la suite de l'insertion de la séquence *ISAba*I en amont du gène *eptA* – Créé avec Servier Medical Art

B. Perte du lipooligosaccharide

En réponse à la pression de sélection exercée par les polymyxines, **une perte du LOS peut être observée en lien avec des mutations ou des délétions dans l'un des gènes *lpxA*, *lpxC* et/ou *lpxD* qui codent pour les enzymes catalysant les trois premières étapes de la voie de biosynthèse du lipide A** (Figure 20) (Moffatt et al. 2010). Seule l'activité de ces enzymes est modifiée, car les modifications génétiques se trouvent dans des régions codantes pour les sites enzymatiques des protéines LpxACD (Moffatt et al. 2010). Ainsi sans lipide A, le LOS ne peut pas être produit et n'est donc plus exprimé à la membrane externe. Ainsi la PMB n'a plus de site de fixation pour exercer son effet bactéricide.

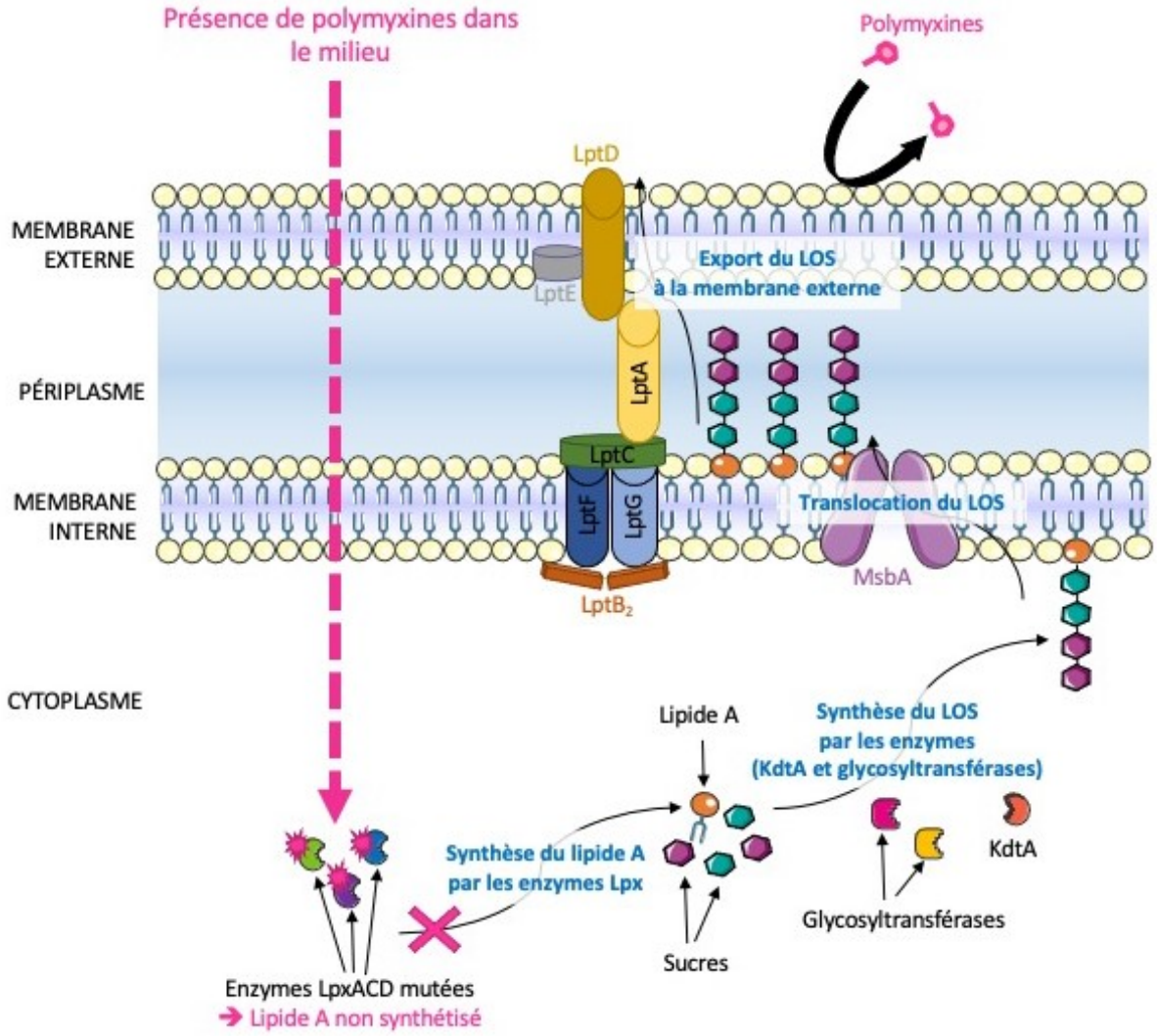


Figure 20. Perte du LOS à la suite mutation dans les gènes *lpxA*, *lpxC* et/ou *lpxD* – Créé avec Servier Medical Art

Chapitre 3 : De multiples méthodes d'évaluation de l'efficacité des antibiotiques

L'étude de l'efficacité des antibiotiques permet d'optimiser leur utilisation, mais aussi de prévenir l'apparition de résistance et ainsi de préserver le panel de molécules à notre disposition. Ainsi, des études pharmacocinétique/pharmacodynamiques (PK/PD) constituent un outil essentiel pour atteindre cet objectif. Pour cela, l'évolution des concentrations des antibiotiques au cours du temps après leur administration permettant de définir leur pharmacocinétique (PK) est étudiée soit chez le patient, soit *in vivo* à l'aide de modèles animaux. L'étude de la relation entre la concentration et l'effet de l'antibiotique permet de définir la pharmacodynamie (PD) des antibiotiques. La combinaison de la PK et de la PD (PK/PD), permet d'étudier l'effet des antibiotiques au cours du temps (Figure 21).

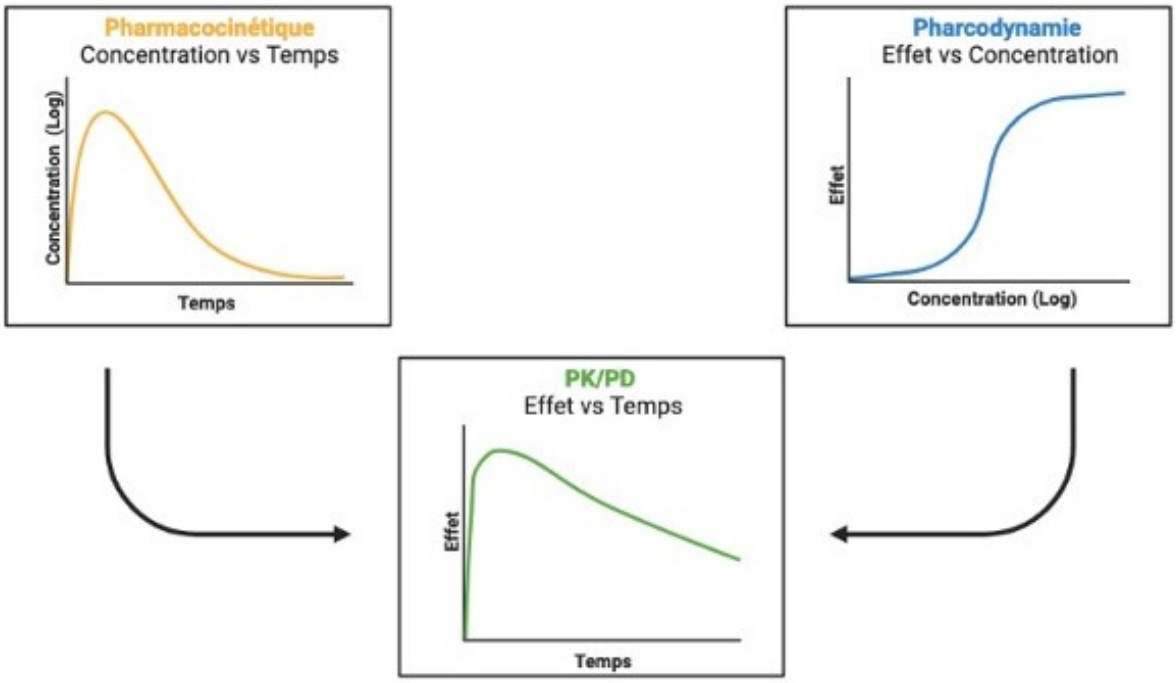


Figure 21. Schéma représentant la pharmacocinétique (PK), la pharmacodynamie (PD) et la pharmacocinétique/pharmacodynamie (PK/PD) – D'après (Derendorf and Meibohm 1999), Créé avec bioRender.com

Plusieurs méthodes, allant de l'*in silico* à l'*in vivo*, sont utilisées pour étudier la PK/PD des antibiotiques. Les avantages et inconvénients de certaines de ces méthodes d'évaluation des antibiotiques seront abordés dans ce chapitre.

I. Méthodes d'étude *in vitro*

La pharmacodynamie des antibiotiques, peut être étudiée *in vitro* par la détermination de la **concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques,** ou par la réalisation de **courbes de bactéricidie** aussi appelées ***time-kill curves*** **(TKC)** que l'on pourrait qualifiées de méthode longitudinale.

A. La mesure de concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est une technique qui permet d'évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Cette concentration est déterminée à l'aide de différentes méthodes, telles que les dilutions sériées par macrodilution, les dilutions sériées par microdilution ou encore la diffusion en gélose. Toutefois, seules les deux dernières sont le plus souvent utilisées (E. I. Nielsen et Friberg 2013), avec 71% et 26% (avec 3% pour les E-test et 23% pour les diffusion en géloses avec disques) des résultats Pubmed (Figure 22) et sont les seules à être standardisées par les instances européennes (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)) et américaines (*Clinical and laboratory standars institute* (CLSI)) (« EUCAST: MIC determination » s. d.; « M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI » s. d.).

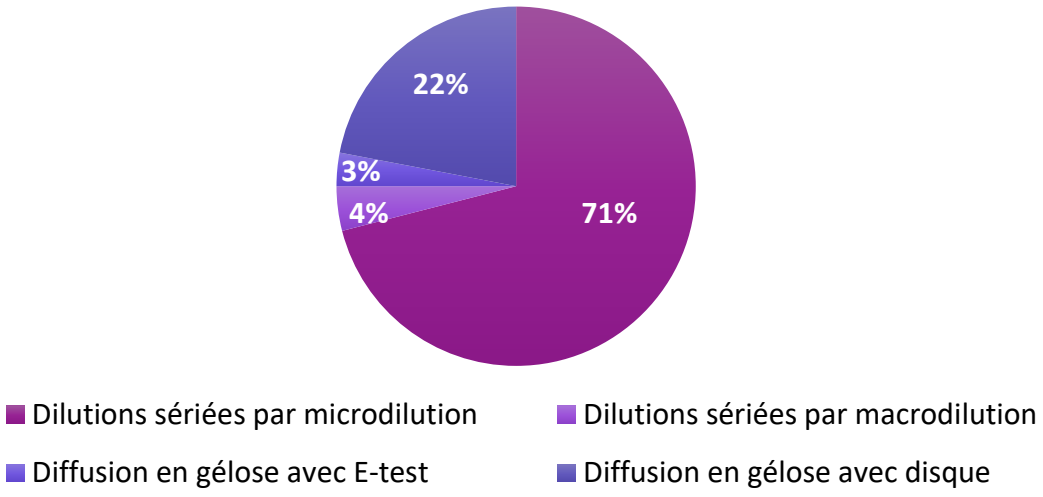


Figure 22. Pourcentages des résultats pour chaque méthode sur PubMed

Pour les **méthodes de diffusion en gélose**, une gélose est inoculée avec une **suspension bactérienne à 0,5 McFarland (correspondant à 1 x 10^8 UCF/mL)** et l'antibiotique diffuse à partir d'un disque ou d'une bande imprégnés dans la gélose (« EUCAST: MIC determination » s. d.). Le E-test et l'antibiogramme sont des exemples de méthodes de diffusion en gélose. Pour la réalisation d'un E-test, une bande imprégnée d'un gradient exponentiel d'antibiotique est utilisée, alors que pour les antibiogrammes, ce sont des disques imprégnés d'une solution antibiotique à une concentration donnée. Cependant, les antibiogrammes ne donnent qu'une estimation de la sensibilité des bactéries. En effet, à l'issue de la période d'incubation (18 ± 2 h) à 35 ± 1°C, la mesure du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque imprégné d'antibiotiques permet de définir si la bactérie est sensible ou résistante à l'antibiotique, comme illustré sur la Figure 23.

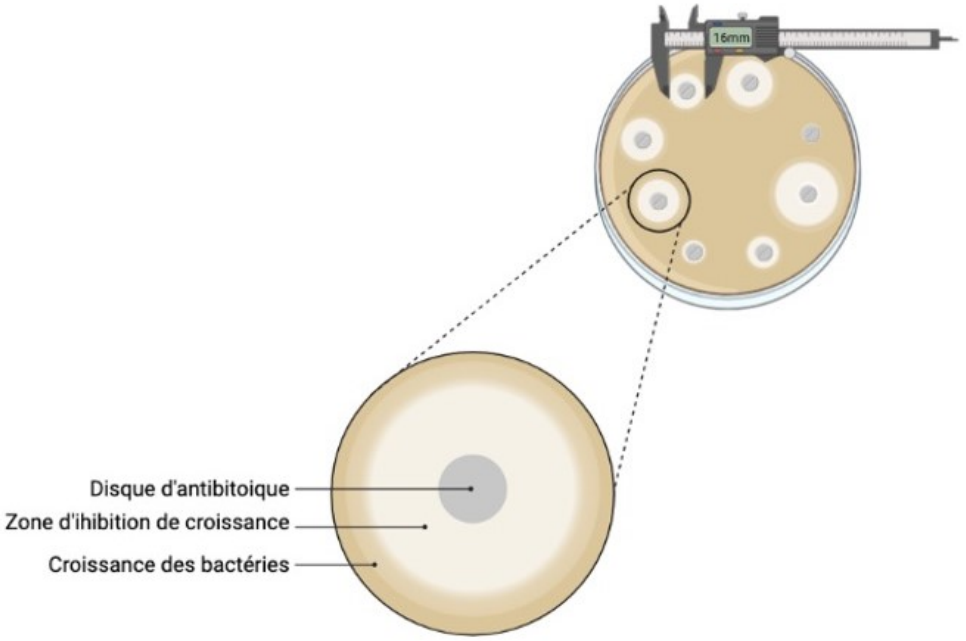


Figure 23. Schéma de la lecture d'un antibiogramme – Crée avec bioRender.com

De même, la CMI avec la méthode du E-test est déterminée à l'œil après 18 ± 2 h d'incubation à 35 ± 1°C. La CMI correspond à la plus faible concentration, indiquée l'échelle de lecture de la bande du E-test à laquelle aucune croissance visible n'est observée, comme illustré sur la Figure 24.

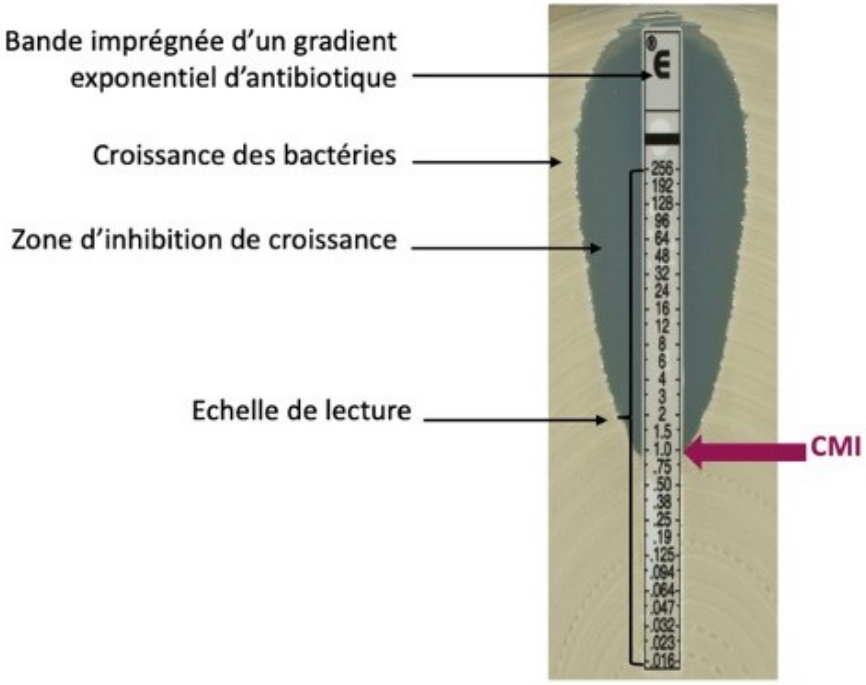


Figure 24. Mesure de la CMI par méthode diffusion en gélose (E-test)

Le E-test et les antibiogrammes sont des techniques plus simples que la technique de dilutions sériées, mais leur utilisation est limitée aux antibiotiques fournis par le fabricant des bandes et disques (E. I. Nielsen et Friberg 2013).

Pour la **méthode de dilution sériée par microdilution**, la bactérie, à un **inoculum initial à 5 x 10^5 UFC/mL**, est mise en contact avec une gamme de concentrations croissantes d'antibiotiques obtenues par dilutions géométriques au demi en série, dans du milieu de culture liquide. La CMI est déterminée à l'œil après une période d'incubation de 18 ± 2 h à 35 ± 1°C. La CMI correspond à la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visible n'est observée, comme illustré dans la Figure 25.

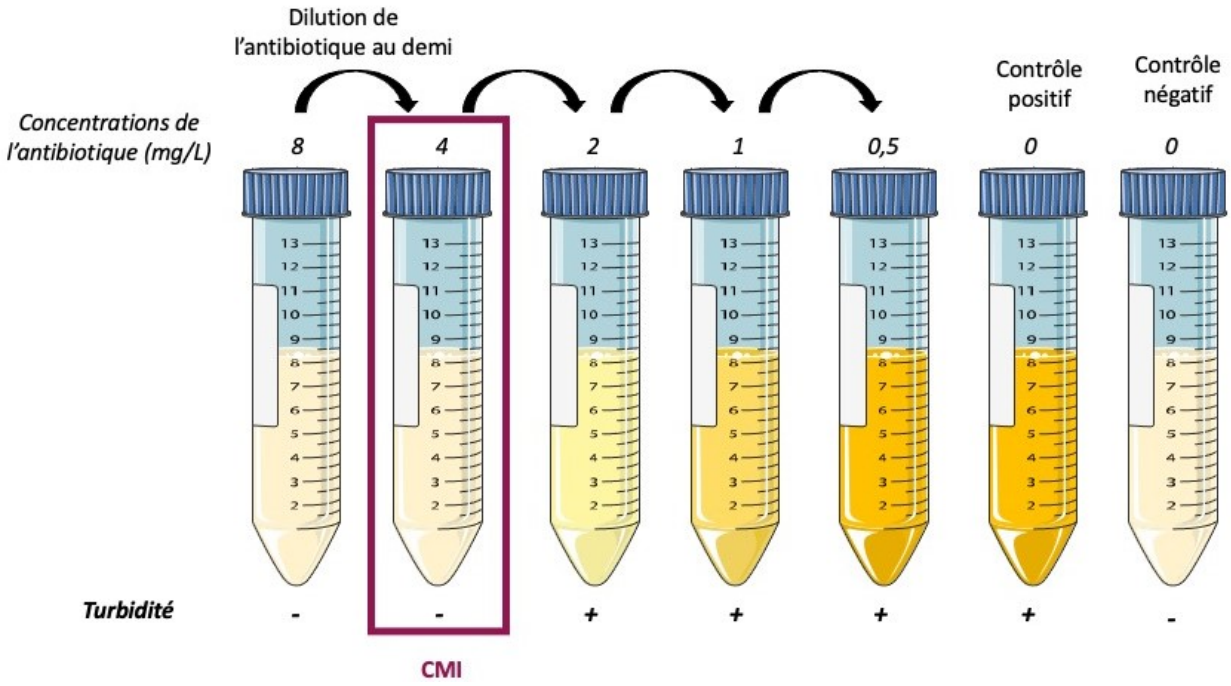


Figure 25. Mesure de la CMI par méthode de dilutions sériées. Les tubes dans lesquels une turbidité est observée (+), correspondent à une croissance bactérienne visible à l'œil nu. La CMI est la plus faible concentration pour laquelle aucune turbidité (-) n'est observée après 18h d'incubation à 35°C. – Créé avec Servier Medical Art

Cependant, bien que peu couteuse et simple, la méthode de **la CMI permet d'évaluer uniquement un effet moyen des antibiotiques** sur la croissance bactérienne induite après 18 h d'incubation, c'est-à-dire **après un temps d'incubation fixe**. De plus, l'approche par dilution au demi et l'inspection visuelle induisent une erreur non négligeable pouvant aller jusqu'à 2 fois la CMI réelle (E. I. Nielsen et Friberg 2013). La **CMI est donc une valeur seuil grossière et monodimensionnelle** qui néglige l'erreur de mesure et tout changement dynamique de la croissance et de la sensibilité au cours de la période étudiée. Par conséquent, la CMI n'apparait pas être le paramètre pharmacodynamique (PD) le plus adéquat pour caractériser l'effet des antibiotiques au cours du temps. Cette relation est plutôt déterminée par l'intermédiaire de courbes de bactéricidie.

B. Les courbes de bactéricidie ou *time-kill curves* (TKC)

Les courbes de bactéricidie ou *time-kill curves* (TKC) sont réalisées par **dénombrement des bactéries viables au cours du temps**. Contrairement à la CMI, **aucune méthode standardisée n'a été définie pour la réalisation des TKC**, ainsi une grande variété de montages et/ou de protocoles expérimentaux a été décrite dans la littérature au cours des dernières décennies (E. I. Nielsen et Friberg 2013). Selon l'objectif de l'étude, les TKC peuvent être réalisées en présence de concentrations en antibiotique constantes (TKC statiques) (Lallemand et al. 2021; Baltch et al. 2011; Aranzana-Climent et al. 2020)ou avec des concentrations en antibitiques variant au cours du temps (TKC dynamiques) (Keil et Wiedemann 1995; White et al. 1987; Nolting et al. 1996; Löwdin et al. 1996; Srivastava et al. 2015; 2016; Louie et al. 2012; Pichereau et al. 2012; Alexia Chauzy et al. 2019), mais aussi en présence de cellules immunitaires (Lallemand et al. 2021; Srivastava et al. 2015; 2016), de bactéries sous forme planctonique (Aranzana-Climent et al. 2020; A. Chauzy et al. 2020) ou de biofilms, ou encore en présence de structures particulières comme des organoïdes (Srivastava et al. 2016). Les TKC statiques sont autant utilisés que les TKC dynamiques (47% contre 53% des résultats sur PudMed pour chaque méthode, respectivement). **Ces différents systèmes expérimentaux permettent d'étudier l'effet des antibiotiques, l'évolution des populations bactériennes, l'émergence de résistance au cours du temps, les interactions entre les différentes parties du système expérimental ou encore la potentielle toxicité des antibiotiques.**

1. Time-kill curves statiques

Un **système "statique"** désigne un système dans lequel **la concentration en antibiotiques ne varie pas au cours du temps**. Ces systèmes sont généralement constitués par des tubes ou des flasques contenant les bactéries, du milieu de culture liquide et des antibiotiques. Il est à noter que dans ces systèmes dits « statiques » les concentrations efficaces en antibiotiques peuvent toutefois varier en raison :

- D'une dégradation de l'antibiotique par des enzymes bactériennes comme les ß-lactamases, macrolides estérases ou d'époxidases (Wright 2005)

- D'une modification de l'antibiotique par des enzymes bactériennes rendant l'antibiotique inefficace comme les acyltransférases, phosphotransférases, thioltransférases, etc… (Wright 2005)
- D'une instabilité de l'antibiotique à 37°C comme pour la céfoxitine par exemple (Mehta et al. 2019)

Grâce à leur simplicité, **ces systèmes permettent de réaliser un grand nombre d'expérimentations avec une large gamme de concentrations, mais aussi de tester les antibiotiques en monothérapie** (Alexia Chauzy et al. 2020) **ou en combinaison** (Aranzana-Climent et al. 2020). Quelques TKC statiques tripartites, c'est-à-dire des **TKC comprenant des cellules immunitaires**, comme des macrophages, des bactéries comme *S. aureus* (Lallemand et al. 2021) ou des champignons tels que *Candida glabrata* (Baltch et al. 2011) et des antibiotiques ou antifongiques ont été également décrites. Ces TKC tripartites permettent d'étudier l'effet des antibiotiques dans des conditions qui se rapprochent davantage de la physiopathologie des infections liées aux soins, mais aussi d'étudier l'interaction entre les cellules immunitaires et les agents pathogènes.

Quel que soit le protocole expérimental de TKC statiques utilisé, **plusieurs types de profils de courbes de bactéricidie** obtenues après comptage des bactéries viables peuvent être observés (Figure 26). Le premier profil (obtenu avec la concentration A) montre que la concentration en antibiotique n'est pas suffisante pour empêcher la croissance bactérienne. Le second profil type (obtenu avec les concentrations B et C) montre une bactéricide initiale suivie d'une repousse pouvant être due à une hétérorésistance, au développement d'une résistance adaptative, ou à l'association des deux types de résistance. Enfin, un dernier type de profil (obtenu avec les concentrations D et E) montrant une bactéricidie sans repousse peut être également observé.

L'hétérorésistance est caractérisée par la présence d'une sous-population bactérienne capable de se multiplier sur une gélose contenant de l'antibiotique en début de TKC. De même, la résistance adaptative peut être observée en cours d'expérimentation par des dénombrements sur géloses contenant de l'antibiotique. Dans une étude *in vitro* utilisant des TKC statiques contre une souche clinique d'*A. baumannii* résistante à la PMB, il a été observé que les concentrations de minocycline < 4 mg/L entraînaient une repousse caractérisée par une amplification des bactéries résistantes à 30 heures, alors qu'aucune hétérorésistance

n'avait été observée. En présence de concentrations en PMB <8 mg/L, la repousse observée était due à une hétérorésistance et une résistance adaptative (Aranzana-Climent et al. 2020).

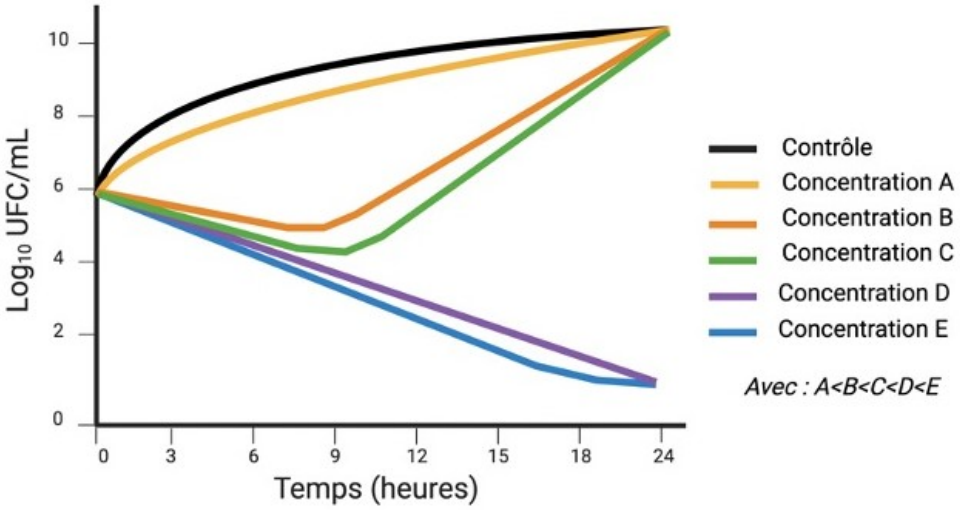


Figure 26. Schéma des profils typiques des courbes de bactéricidie – Créé avec bioRender.com

2. Time-kill curves dynamiques

A contrario, si le système expérimental permet de faire varier la concentration en antibiotique au cours du temps, on parle d'un **système « dynamique** ». Ces systèmes sont plus complexes que les systèmes statiques, mais ils ont l'avantage de **permettre de simuler la PK observée chez les patients ou dans les modèles animaux *in vivo***. Les systèmes dynamiques sont divisés en deux types : (i) les systèmes basés sur la dilution ou (ii) les systèmes basés sur la diffusion ou la dialyse.

a. Systèmes dynamiques basés sur la dilution

Les **systèmes basés sur la dilution** permettent de faire varier les concentrations en antibiotiques par ajout continu ou graduel de milieu du culture liquide frais sans antibiotique dans **un unique compartiment** central contenant les bactéries et les antibiotiques. L'inconvénient de ce système est qu'une perte et une dilution bactérienne peuvent être observées au cours de l'expérimentation (Keil et Wiedemann 1995; White et al. 1987). Ainsi,

l'ajout d'un réservoir annexe où le surplus de volume sera éliminé permet d'éviter une dilution des bactéries ; et l'ajout d'un filtre ou d'une membrane à la sortie du compartiment central vers ce compartiment annexe permet d'éviter la perte bactérienne (Nolting et al. 1996; Löwdin et al. 1996) (Figure 27).

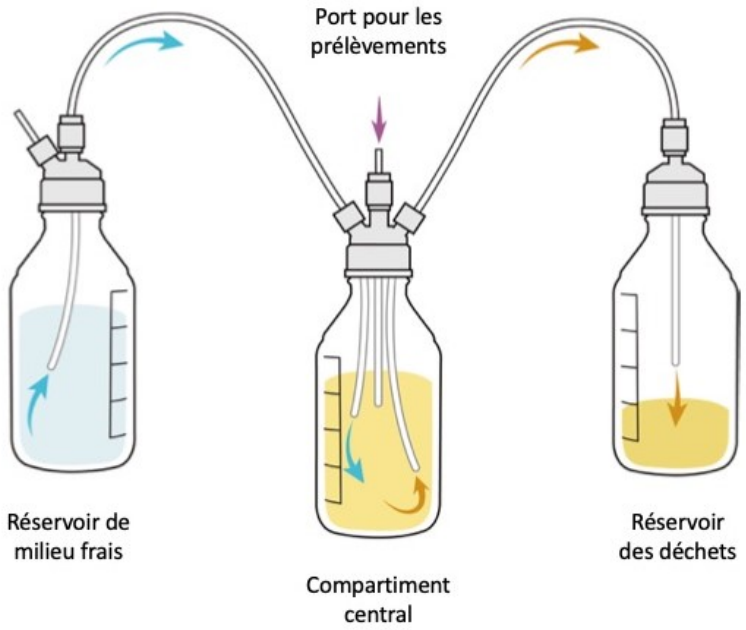


Figure 27. Schéma d'un système dynamique basé sur la dilution - D'après (Rose 2016)

b. Systèmes dynamiques basés sur la diffusion ou la dialyse

Les **systèmes basés sur la diffusion ou la dialyse** sont composés de **deux compartiments : un compartiment central et un compartiment** périphérique, tous deux séparés par une membrane semi-perméable. Les systèmes basés sur la diffusion ou la dialyse sont couramment appelés des ***hollow-fibers*** (Figure 28).

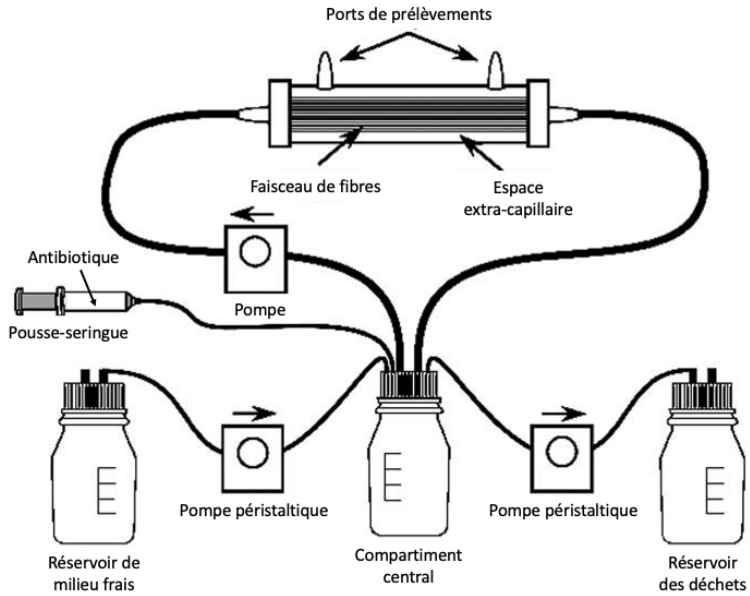


Figure 28. Schéma d'un système dynamique "*hollow-fibers*" basé sur la dialyse – D'après (Drusano et al. 2011)

Tout comme dans les systèmes basés sur la dilution, les concentrations en antibiotiques du compartiment central sont diminuées par l'ajout de milieu de culture liquide frais de façon continue, et le surplus de milieu est éliminé dans un compartiment annexe afin de maintenir un volume constant. L'antibiotique se trouvant dans le compartiment central diffuse à travers des fibres creuses semi-perméables dans le compartiment périphérique contenant les bactéries. Ainsi, le milieu dans le compartiment périphérique est continuellement renouvelé par diffusion (depuis le compartiment central), tout en permettant à l'antibiotique d'interagir avec les bactéries. Les bactéries, quant à elles, sont emprisonnées dans le compartiment périphérique et ne peuvent pas traverser les fibres.

Pour se rapprocher de la physiopathologie de certaines infections, quelques équipes ont complexifié le système des *hollow-fibers.* Certains ont introduit dans le compartiment périphérique des **cellules immunitaires**, commes les macrophages, **préalablement infectées** par bactéries telles que *Mycobacterium kansasii* (Srivastava et al. 2015). D'autres, pour reproduire la dissémination pédiatrique de la tuberculose, ont placé dans le compartiment périphérique des macrophages infectés par des bactéries *Mycobacterium tuberculosis*. Pour étudier l'hépatotoxicité potentiellement engendrée par le traitement antituberculeux, un 3ème compartiment contenant une culture d'organoïdes de foie en 3D emprisonnés dans des billes

d'alginate a été ajouté entre le compartiment central et le compartiment périphérique comme illustré sur la Figure 29 (Srivastava et al. 2016).

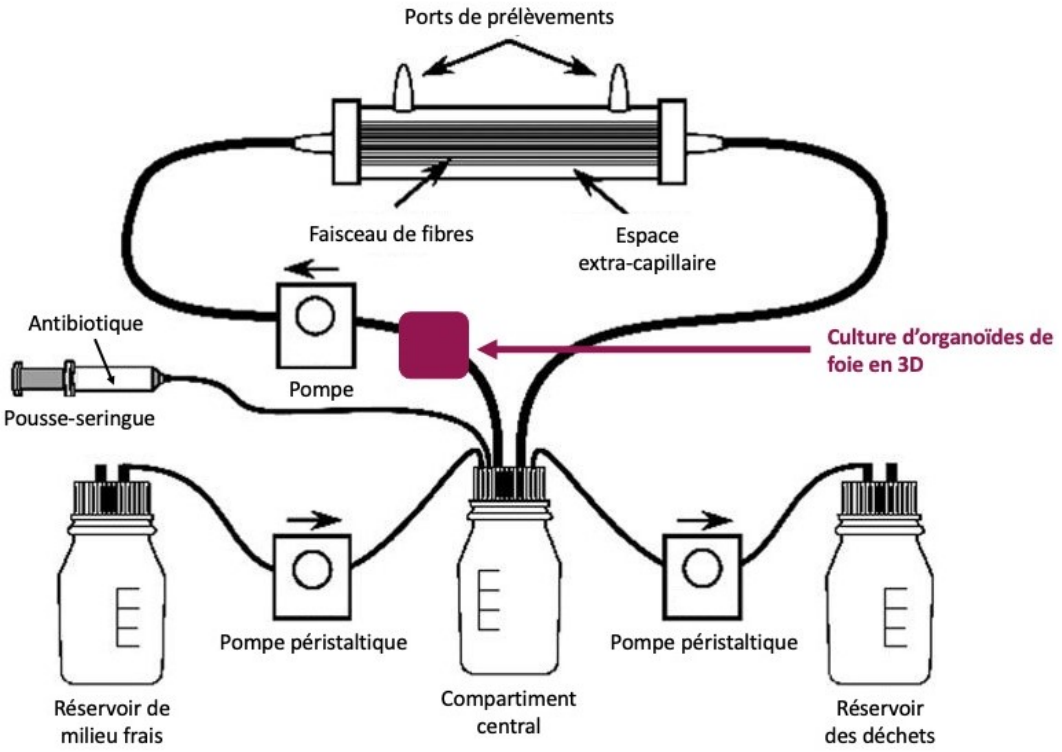


Figure 29. Schéma du montage expérimental de Srivastava *et al.* 2016

D'autres ont utilisé les *hollow-fibers* pour étudier, en plus de la bactéricidie des antibiotiques, **l'effet des antibiotiques sur la sécrétion de protéines bactériennes, telles que des toxines et facteurs de virulence**. En effet, les bactéries se situant dans l'espace extra-capillaire, celui-ci contient également les molécules sécrétées par celles-ci (Figure 30). Ainsi, l'effet de la ciprofloxacine et du linézolide sur la production d'une toxine par *Bacillus anthracis* (Louie et al. 2012), ou encore l'effet de la clindamycine, du linézolide, de la minocycline et de la vancomycine sur la production d'une toxine par *S. aureus* ont été étudié (Pichereau et al. 2012). Par exemple, il a été montré qu'après 72 h, la clindamycine, le linézolide, et la minocycline diminuaient la production de la toxine PVL par *S. aureus* d'au moins un facteur 3 ; la vancomycine, n'ayant aucun effet (Pichereau et al. 2012).

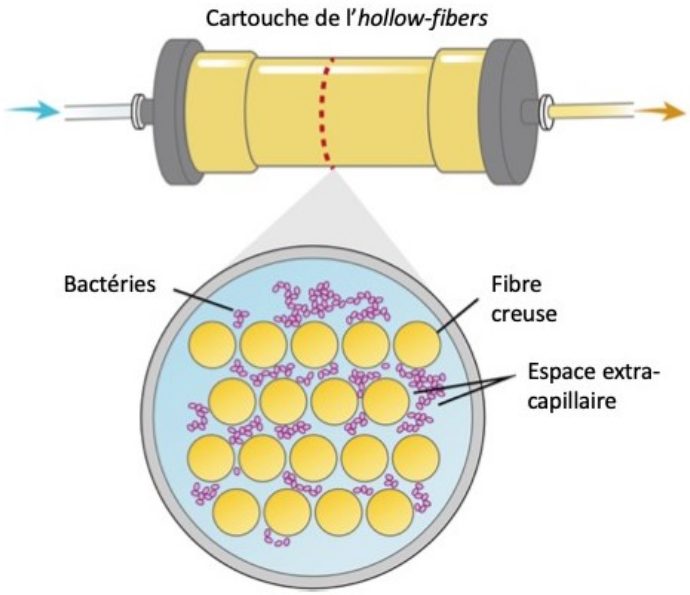


Figure 30. Schéma d'une coupe transversale d'une cartouche d'*hollow-fibers* - D'après (Rose 2016)

De plus, contrairement aux TKC statiques, dont la durée varie entre 24 h et 30 h (S. M. Nielsen et al. 2016; Aranzana-Climent et al. 2020; Alexia Chauzy et al. 2020), les *hollow-fibers* pouvant durer **jusqu' à 28 j** (Srivastava et al. 2016) permettent **d'étudier les phénomènes de résistance survenant au-delà des 30 h d'expérimentation** (Drusano et al. 2021). Par exemple, l'émergence de résistance chez une souche *P. aeruginosa* n'exprimant pas la ß-lactamase *Pseudomonas-derived cephalosporinase* (PDC) en présence de différents schémas posologiques de l'association ceftazidime/avibactam a été étudiée avec des *hollow-fibers* sur une durée de 10 j (Drusano et al. 2021). Ainsi, une population de résistante a été observée à partir de 2 j d'expérimentation lorsque les concentrations d'avibactam étaient compris entre 1 et 3 mg/L (en perfusion continue) avec une dose de 2 g de ceftazidime toutes les 8 h, en perfusion de 2 h. Entre 2 j et 4 j d'expérimentation, la population sensible est a été réduite au profit de la population résistante. Au bout des 4 j d'expérimentation, la population bactérienne était composée uniquement par la population résistante.

Cependant, même si les *hollow-fibres* permettent de reproduire certaines conditions physiopathologiques et de mimer la PK des antibiotiques observées en clinique ou lors d'études *in vivo*, ils présentent **deux inconvénients majeurs**. Le premier est une **possibilité de**

contamination plus importante que les TKC statiques en raison de la complexité du montage, de la méthode des prélèvements bactériens qui se font, contrairement aux TKC statiques, dans des conditions non stériles (hors poste de sécurité microbiologique), mais aussi de la longue durée de l'expérimentation. De plus, **les *hollow-fibres* constituent une méthode dont le coût est nettement plus élevé que les TKC statiques** en lien avec une grande quantité de milieu de culture et de solutions d'antibiotique utilisées, mais aussi avec la cartouche de dialyse commerciale à usage unique, généralement utilisée, dont le coût serait d'environ 500€.

II. Méthodes d'étude *in vivo*

Bien que les modèles animaux soient moins flexibles que les systèmes *in vitro*, **les études *in vivo* permettent une plus grande souplesse que les études cliniques**, car elles permettent d'**étudier plusieurs aspects de la physiopathologie des infections bactériennes** comme la virulence, la relation hôte-pathogène, la pharmacodynamie et pharmacocinétique des antibiotiques (Marra 2012). Dans le cas d'*A. baumannii,* différents modèles animaux infectieux, non mammifères et mammifères, ont été décrits (D. Wong et al. 2017).

A. Modèles animaux infectieux alternatifs à *A. baumannii*

Des modèles non mammifères comme les nématodes *Caenorhabditis elegans* (Proulx et al. 2020; Espinal et al. 2019), les larves de la fausse teigne *Galleria mellonella,* ou encore les embryons de poissons-zèbres *Danio rerio* peuvent être utilisés comme **alternatives aux modèles murins pour l'étude des interactions hôtes-pathogènes et des facteurs de virulence** de bactéries pathogènes comme *A. baumannii* (Marra 2012).

Par rapport aux modèles vertébrés, les nématodes *C. elegans* et les larves de *G. mellonella*, étant donné leur faible coût, permettent des expérimentations avec un plus grand nombre d'animaux, d'autant plus que contrairement aux modèles animaux vertébrés (comme les poissons-zèbres *D. rerio* et les mammifères), ils nécessitent aucune approbation éthique (Mannix-Fisher et McLean 2021; « Animaux utilisés à des fins scientifiques » s. d.).

Le ver rond *C. elegans* grâce à la simplicité de son organisme, sa transparence et de sa facilité de culture font de lui le modèle animal le plus simple pour l'étude des interactions hôte-pathogène (Dey, Park, et Kang 2020). Son système immunitaire est composé uniquement d'un

système immunitaire innée, faisant de lui un modèle animal invertébré idéal pour étudier les réponses initiales de l'hôte contre les agents pathogènes (Dey, Park, et Kang 2020; Apfeld et Alper 2018). *C. elegans* peut être aussi utilisé pour les études de criblage des facteurs de virulence (Espinal et al. 2019).

Les larves de *G. mellonella*, sont faciles à manipuler et nécessitent aucun équipement spécialisé pour leur entretien. De plus, elles peuvent survivre à des températures adaptées à la recherche d'agents pathogènes humains (25-37°C) (Mannix-Fisher et McLean 2021). Leur simple système immunitaire permet de mimer le système immunitaire inné des mammifères (Hernandez et al. 2019). En effet, la virulence bactérienne chez *G. mellonella* a été montrée comme étant corrélée à la virulence observée chez la souris, ainsi que dans les macrophages. Ainsi, les larves de *G. mellonella* constituent aussi une bonne alternative en tant que modèle animal invertébré pour les études de la relation hôte-pathogène et de virulence. Elles peuvent être aussi utilisé pour un criblage d'antibiotiques (Mannix-Fisher et McLean 2021; Hernandez et al. 2019).

Le poisson-zèbre *D. rerio* est un poisson tropical d'eau douce dont le système immunitaire est remarquablement similaire à celui des humains, avec des voies de réponse immunitaire innées et adaptatives élaborées (Bhuiyan et al. 2016). À l'état d'embryon, c'est-à-dire jusqu'à 3 semaines post-fertilisation, son système immunitaire est similaire au système immunitaire inné humain. À ce stade, il est composé des composants solubles (les opsonines, les cytokines, les chimiokines et le complément), mais aussi du répertoire cellulaire inné des cellules présentatrices d'antigènes et phagocytaires. Au-delà de cette période, son système immunitaire adaptatif est fonctionnel. Ainsi, les embryons de poissons-zèbres *D. rerio* sont un modèle animal vertébré idéal pour l'étude de la réponse immune innée de l'hôte (Bhuiyan et al. 2016).

B. Modèles animaux mammaliens à *A. baumannii*

Les modèles animaux mammaliens, tels que les rongeurs (souris, rats et cochons d'Inde) et les lagomorphes (lapins) permettent d'étudier la réponse immunitaire ou encore la virulence dans un organisme plus complexe que ceux précédemment cités. Ils sont **couramment utilisés pour étudier l'efficacité des antibiotiques *in vivo***. La pharmacodynamie des antibiotiques est

généralement étudiée en dénombrant les bactéries viables présentes dans les tissus et fluides. Ces données PD peuvent être couplées à la pharmacocinétique plasmatique et/ou tissulaire des antibiotiques. Les modèles animaux permettent d'**identifier les schémas posologiques permettant d'atteindre les cibles désirées selon la classe des antibiotiques**. Pour cela des **index PK/PD** permettant de relier les paramètres PK des antibiotiques à la pharmacodynamie grâce à la CMI sont utilisés. Les trois index PK/PD le plus couramment utilisés sont lessuivants : AUC/CMI, C_{max}/CMI et $T_{>CMI}$ (Figure 31). L'AUC, ou aire sous la courbe des concentrations au cours du temps, représente l'exposition cumulée de l'antibiotique. La C_{max}, ou concentration maximale, correspond à la plus forte concentration atteinte ou estimée dans le compartiment de référence après administration de l'antibiotique. Et le $T_{>CMI}$ correspond à la durée durant laquelle les concentrations en antibiotiques sont supérieures à la valeur de la CMI.

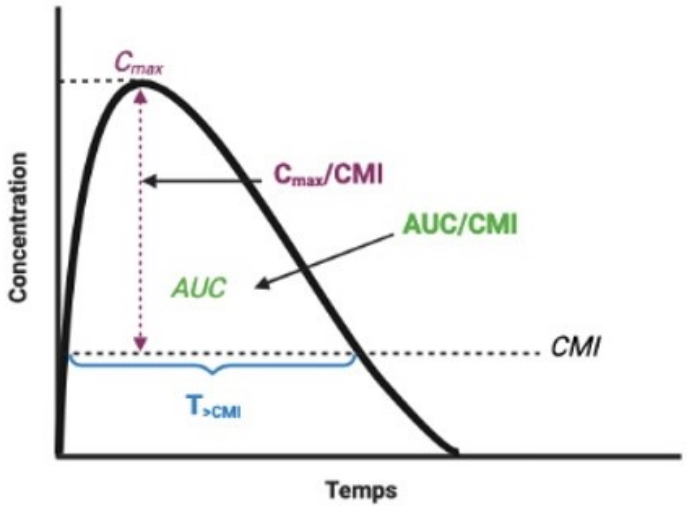


Figure 31. Schéma des index PK/PD - Créé avec Biorender.com

Des modèles mammaliens infectieux à *A. baumannii,* comme des modèles de pneumonie, d'infections de la peau survenant après une brûlure, d'ostéomyélite, d'endocardite, de méningite, de péritonites ou encore de septicémie, ont été décrits dans la littérature (McConnell, Actis, et Pachón 2013; Xiong et al. 2017; Luo et al. 2012; Collinet-Adler et al. 2011; Park et al. 2011; G. Harris et al. 2019; 2013; Y.-W. Lin et al. 2018; Palmer et al. 2019; Zhou et al. 2017). Cependant, quelle que soit la bactérie utilisée, les souris et rats sont généralement les modèles mammaliens de prédilections en raison de leur faible coût et leur facilité de manipulation (E. I. Nielsen et Friberg 2013). Par ailleurs, **les modèles d'infection de la cuisse**

et du poumon chez la souris neutropénique sont les modèles infectieux les plus couramment utilisés car ils sont considérés comme une étape nécessaire entre les études *in vitro* et les études cliniques. Cependant, il est important de garder en mémoire que la physiopathologie, le système immunitaire et la PK des antibiotiques varient entre les espèces animales rendant souvent les extrapolations inter-espèces délicates (Tängdén et al. 2020).

1. Modèle murin neutropénique d'infection de la cuisse à *A. baumannii*

Le modèle murin d'infection de la cuisse permet de mimer les infections des tissus mous observées en clinique. Le principal avantage de ce modèle est **sa simplicité** et la **faible variabilité intra- et inter-études**. L'infection restant localisée, ce modèle infectieux permet de doubler les échantillons en infectant les muscles des deux pattes antérieures. Cette méthode permet aussi d'étudier la PD des antibiotiques sur différentes souches/espèces bactériennes avec une seule souris. Ces différents avantages permettent donc de **réduire le nombre d'animaux utilisé**. Par ailleurs, dans ce modèle, les bactéries peuvent atteindre une densité bactérienne de 10^7-10^8 UFC/cuisse, ce qui en fait **un modèle idéal pour l'étude d'infections de sévérité différentes** (Marra 2012).

Ce modèle a été utilisé pour **étudier l'efficacité de divers antibiotiques utilisés en monothérapie ou en combinaison** (Fan et al. 2016; A. D. Kang et al. 2018; M. D. Barnes et al. 2019). Le modèle murin d'infection de la cuisse a été décrit pour la première fois par Eagle *et al.* en 1950 (Eagle, Fleischman, et Musselman 1950). Dans cette étude, des souris immunocompétentes ont été utilisées pour évaluer l'effet de la pénicilline G sur la croissance de souches de *S. pneumoniae* et *Streptococcus* ß-hémolytique *in vivo* (Eagle, Fleischman, et Musselman 1950). Plus tard, ce modèle a été modifié avec l'utilisation de souris neutropéniques pour se rapprocher de la physiopathologie des infections causées par *P. aeruginosa* chez les patients immunodéprimés (A. U. Gerber et al. 1983; Andreas U. Gerber et al. 1982; Vogelman et al. 1988). Aujourd'hui, **des agents immunosuppresseurs**, comme le cyclophosphamide, **sont souvent utilisés dans les modèles murins afin de réduire le nombre de neutrophiles dans la circulation sanguine**. Cela permet aux bactéries d'initier l'infection en l'absence d'une réponse immunitaire induite par la reconnaissance des agents pathogènes par les neutrophiles. Plusieurs protocoles d'induction de la neutropénie au cyclophosphamide

ont été décrits, mais le plus couramment utilisé consiste en une administration intrapéritonéale de 150 mg/kg de cyclophosphamide 4 j avant l'infection, et de 100 mg/kg de la veille de l'infection (Marra 2012; A. D. Kang et al. 2018; M. D. Barnes et al. 2019; Fan et al. 2016; Becker et al. 2021; Monogue et al. 2018; Cheah et al. 2015; Dudhani et al. 2010; Nakamura et al. 2019; Yokoyama et al. 2014). Les souris sont ensuite infectées par **administration intramusculaire** de 100 µL d'une suspension de bactéries en phase logarithmique au niveau de la patte postérieure**.** Les antibiotiques sont généralement administrés 2 heures après infection. Pour déterminer la charge bactérienne, les souris sont sacrifiées, puis les muscles des cuisses prélevés sont homogénéisés (Sabet, Tarazi, et Griffith 2020; MacVane, Crandon, et Nicolau 2014; Cheah et al. 2015; Yokoyama et al. 2014).

Grâce à ce modèle infectieux à *A. baumannii*, Fan *et al.* ont étudié la PD de différentes combinaisons d'antibiotiques comprenant de la CST et un autre antbiotique (méropénème, tigécycline, fosfomycine, acide fusidique, rifampicine et sulbactam) (Fan et al. 2016). Des souris neutropéniques BALB/c femelles infectées avec 3 x 10^6 UFC/souris ont été utilisées pour cette étude. Les combinaisons d'antibiotiques ont été testées sur un panel de 12 souches cliniques multirésistantes isolées à partir d'expectoration de patients atteints de pneumonie, à partir du sang ou encore de l'urine de patients issus d'un hôpital tertiaire. Les souris ont été euthanasiées 24 h ou 48 h après l'administration des antibiotiques. Les combinaisons d'antibiotiques induisant une diminution ≥ 2 $\log_{10}$ UFC/mL par rapport la CST en monothérapie ont été définies comme étant synergiques, et antagonistes en cas d'une augmentation ≤ 2 $\log_{10}$ UFC/mL par rapport à la CST seule. Il en résulte que seules les combinaisons de la CST avec la rifampicine ou de l'acide fusidique ou du méropénème avaient un effet synergique dès 24h sur 100%, 58,3% et 33,3% des souches testées, respectivement.

L'efficacité de l'apramycine (à 20, 80 ou 500 mg/kg) a été également évaluée dans un modèle d'infection de la cuisse avec des femelles CD-1 inoculées avec 10^6 ou 10^7 UFC selon la souche clinique d'*A. baumannii* utilisée (C.-I. Kang et al. 2004). Dans un premier temps, l'étude de la PK de l'apramycine a été réalisée chez des souris neutropéniques non infectées ayant été traité 3 jours avant l'étude PK par du nitrate d'uranyle (5 mg/kg par voie intrapéritonéale) afin de simuler une excrétion humaine. L'apramycine présentait une élimination linéaire et une C_{max} de 29, 242 et 2100 mg/L pour les doses à 20, 80 et 500 mg/kg, respectivement. Pour l'étude PD, les souris infectées ont été sacrifiées 24h après administration de l'apramycine.

L'efficacité de l'apramycine variait selon la souche. Cependant, la dose de 500 mg/kg était la plus efficace, quelle que soit la souche clinique d'*A. baumannii* utilisée avec une réduction de 4, 5 et 7 log_{10} UFC/souris pour chacune des trois souches cliniques d'*A. baumannii*.

2. Modèles murins neutropéniques d'infection pulmonaire à *A. baumannii*

Dans ce modèle infectieux, **les souris neutropéniques sont anesthésiées** par administration intrapéritonéale d'un cocktail d'anesthésiants/hypnotiques ou sédatifs/analgésiques (avec par exemple : kétamine (500 µg/souris) + médétomidine (15 µg/souris) (Vázquez-Ucha et al. 2019) ou kétamine (100 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) (Ku et al. 2019) ou médétomidine (5 mg/kg) + midazolam (4 mg/kg) + butorphanol (5 mg/kg) (Yokoyama et al. 2014)), ou par inhalation d'isoflurane mélangé à de l'oxygène (Ma et al. 2020, 20; Monogue et al. 2018). **Les souris sont ensuite infectées par voie intranasale ou par voie intratrachéale**. Pour l'infection intranasale, des gouttes de 30 à 50 µL (Marra 2012) d'une suspension bactérienne sont déposées au niveau des narines des souris. Dans le cas de l'infection intratrachéale, l'inoculum est administré au niveau de la trachée soit à l'aide d'une seringue Hamilton (Vázquez-Ucha et al. 2019), d'un microSpayer (Zhou et al. 2017), soit à l'aide d'une canule (Breij et al. 2012). **Ces deux voies d'administration de l'inoculum (intranasale ou intra-trachéale) permettent d'établir une infection au niveau des deux lobes pulmonaires** (Marra 2012). Le temps d'attente entre l'infection et l'administration des antibiotiques varie entre 1 h 30 et 4 h selon le protocole utilisé (Ku et al. 2019; Ma et al. 2020; Vázquez-Ucha et al. 2019; Becker et al. 2021; Zhou et al. 2017; Cheah et al. 2015). Comme pour le modèle d'infectiond de la cuisse, les souris sont sacrifiées et les poumons prélevés sont homogénéisés pour déterminer la charge bactérienne.

Ainsi, la PK/PD de la combinaison de l'imipénème et d'un inhibiteur de BLSE, le LN-1-255, a été étudiée dans un modèle murin d'infection pulmonaire (Vázquez-Ucha et al. 2019). Dans cette étude, des mâles immunocompétents BALB/c âgés de 9 à 11 semaines ont été infectés, par voie intratrachéale avec une seringue Hamilton, par des souches cliniques d'*A. baumannii* exprimant OXA-23 ou OXA-24/40, ou par des souches mutantes ATCC19606 exprimant ces BLSE. L'inoculum bactérien était mélangé avec de la mucine porcine (10 %), en remplacement

de l'utilisation du cyclophosphamide, pour favoriser l'installation de l'infection pulmonaire. Les souris ont été traitées, 1h30 après l'infection.

La PK plasmatique et pulmonaire du LN-1-255 (20, 50 et 150 mg/kg) a été obtenue à partir de prélèvements sanguins (à 0, 30, 45, 60, 90, 120 et 180 min) et de prélèvements de l'*epithelial lining fluid* (ELF) (à 0, 30, 90, 150, 220 et 340 min) (Vázquez-Ucha et al. 2019). Il en résulte, qu'avec une dose de 50 mg/kg, le LN-1-255 atteint une C_{max} plasmatique de 5,4 mg/L et une C_{max} pulmonaire de 5,6 mg/L, avec une demi-vie ($t_{1/2}$) respective de 22 et 98 min. L'AUC était plus importante au niveau pulmonaire (4,1 mg.h/L) qu'au niveau plasmatique (2,8 mg.h/L). La C_{max} et l'AUC obtenues avec la dose de 20 mg/kg étaient inférieures à celles obtenues avec la dose de 50 mg/kg. La dose de 150 mg/kg a permis d'atteindre une C_{max} pulmonaire augmentée de 20% par rapport à celle obtenue à 50 mg/kg.

Une étude de toxicité sur 7 j a montré que toutes les doses uniques testées de LN-1-255 (150 et 350 mg/kg) étaient tolérées par les animaux. Aucune mortalité et aucun signe clinique d'intolérance/toxicité, comme des spasmes musculaires, perte de poids ou trouble du mouvement transitoire, n'ont été observés.

Pour étudier la PD de l'imipénème (30 mg/kg) seul ou en combinaison avec le LN-1-225 (50 mg/kg), les souris ont reçu des doses répétées toutes les 3 h, puis elles ont été sacrifiées 24h après le début de l'antibiothérapie. La combinaison imipénème/LN-1-255 était plus efficace que l'imipénème seul quelle que soit la souche utilisée. Par exemple, par rapport à la charge bactérienne déterminée au début du traitement, une diminution de 2 $\log_{10}$ UFC/g poumon chez les souris infectées par la souche clinique exprimant OXA-24/40 traitées avec la combinaison ; alors qu'une augmentation de 1,5 $\log_{10}$ UFC/g poumons a été observée chez celles ayant reçu uniquement de l'imipénème.

Dans une autre étude, l'efficacité de la combinaison CST/linézolide a été évaluée sur des femelles neutropéniques C57BL/6J de 6 semaines infectées par voie intranasale avec un inoculum à 5 x 10^7 UFC/souris de 2 souches cliniques d'*A.* baumannii multirésistantes isolées chez des patients d'atteints d'une pneumonie avec une bactériémie (Ma et al. 2020). L'antibiothérapie a été initiée 4 h après l'infection : la CST (125 000 UI/kg toutes les 6 h) et le linézolide (50 mg/kg toutes les 12 h) ont été administrés en monothérapie ou en combinaison. Une étude de survie sur 4 j et une cinétique de bactéricide sur 76 h ont été réalisées. Un effet

synergique a été défini lorsqu'une diminution ≥ 2 log_{10} UFC/mL était observée avec la combinaison par rapport l'antibiotique le plus efficace en monothérapie ; et un effet bactéricide lorsqu'une diminution ≥ 3 log_{10} UFC/mL était observée en monothérapie par rapport à la charge bactérienne déterminée au début de traitement. Quelle que soit la souche d'*A. baumannii* utilisée, la combinaison CST/linézolide conduisait à un meilleur taux de survie comparé à celui observé chez les souris traitées uniquement avec la CST (72% contre 32% pour la combinaison et la CST pour la première souche clinique, et 92% contre 68% pour la seconde). De plus, il a été observé qu'en monothérapie la CST n'avait aucun effet bactéricide, quelle que soit la souche d'*A. baumannii* utilisée. Son association avec le linézolide a permis d'obtenir un effet synergique, avec une décroissance continue jusqu'à 76 h. Ainsi, avec la combinaison une diminution de 2,32 log_{10} UFC/g de poumon a été observée chez les souris infectées par la première souche ; et une diminution de 2,91 log_{10} UFC/g poumon a été observée chez celles infectées par la seconde souche.

3. Modèle murin d'infection de la cuisse vs. Modèle murin d'infection pulmonaire à *A. baumannii*

Pour aller plus loin, certains auteurs ont comparé l'efficacité des antibiotiques dans les deux types de modèles infectieux (Yokoyama et al. 2014; Monogue et al. 2018; Cheah et al. 2016; Dudhani et al. 2010; Nakamura et al. 2019).

Par exemple, Monogue *et al.*, ont comparé l'efficacité du tazobactam administré en monothérapie ou en combinaison avec la CST sur une souche clinique sensible aux carbapénèmes et une souche clinique multirésistante dans les deux modèles murins infectieux (Monogue et al. 2018). Le but de cette étude était de tester l'effet potentialisateur du tozabactam sur l'activité de la CST avec des schémas posologiques permettant d'obtenir une exposition plasmatique au tazobactam (0,5 g toute les 6 h, administré par voie sous-cutanée) et de la CST (10 mg/kg, administré par voie intrapéritonéale) chez la souris similaire à celles observées chez les humains. Dans cette étude, des femelles ICR neutropéniques ont été utilisées. Dans le modèle d'infection pulmonaire, les souris ont été infectées avec l'une des deux souches avec un inoculum à 5 x 10^5 UFC/souris par voie intranasale et le traitement au tazobactam et de la CST administrés en monothérapie et combinaison, ont été initiés 4 h post

infection. Dans le modèle d'infection de la cuisse, les souris infectées avec 10^6 UFC/souris, ont été traitées (par tazobactam et CST administrés seuls ou en combinaison) 2 h post inoculation. Dans les deux modèles infectieux, les souris ont été sacrifiées 24 h plus tard et la charge bactérienne a été déterminées à partir des organes prélevés. Comme dans les études précédentes, un effet synergique a été défini par une diminution ≥ 2 $\log_{10}$ UFC/mL avec la combinaison par rapport l'antibiotique le plus efficace en monothérapie.

L'efficacité des antibiotiques, en monothérapie et en combinaison, sur la souche sensible variait selon le modèle infectieux utilisé. En effet, dans le modèle d'infection de la cuisse la combinaison tazobactam/CST n'a montré aucune efficacité avec une augmentation de la densité bactérienne de 0,32 $\log_{10}$ UFC, alors que dans le modèle d'infection pulmonaire cette combinaison a permis de réduire la charge bactérienne de 1,05 $\log_{10}$ UFC. La combinaison tazobactam/CST n'a montré aucune efficacité sur la souche multirésistante avec une augmentation de 1,32 et de 2,12 $\log_{10}$ UFC dans le modèle d'infection de la cuisse et du poumon, respectivement.

L'efficacité du sulbactam sur la souche de référence *A. baumannii* ATCC19606 dans un modèle murin neutropénique d'infection de la cuisse et du poumon a été évaluée (Yokoyama et al. 2014). Pour cela des femelles neutropéniques ddY de 5 semaines ont été infectées par voie intranasale (3,75 x 10^5 UFC/souris) ou par voie intramusculaire (3,75 x 10^5 UFC/souris) au niveau du muscle d'une des pattes postérieures. Pour favoriser l'infection pulmonaire, l'inoculum bactérien a été mélangé avec 6% de mucine porcine. Le sulbactam (15-240 mg/kg) a été administré par voie sous-cutanée 2h après l'inoculation dans les deux modèles infectieux selon 18 schémas posologies différents. Les organes ont été prélevés 24 h après l'initiation de l'antibiothérapie. Quel que soit le modèle infectieux utilisé, l'index PK/PD le plus approprié pour décrire l'efficacité du sulbactam *in vivo* était le $fT_{>CMI}$. De plus, une diminution maximale de 4,86 $\log_{10}$ UFC/souris et de 6,44 $\log_{10}$ UFC/souris dans le modèle d'infection de la cuisse et du poumon respectivement, a été observée. Ce qui signifie que le sulbactam était légèrement plus efficace dans le modèle d'infection pulmonaire.

III. Une standardisation des protocoles, une nécessité pour la lutte contre l'antibiorésistance

Ainsi, quelques **différences sont observées entre ces protocoles**. Selon les études le statut immunitaire, le sexe, la lignée et l'âge des souris variaient. La taille de l'inoculum utilisée varie aussi d'une étude à l'autre. Par ailleurs, dans le modèle murin d'infection de la cuisse, certains infectaient qu'une cuisse (Yokoyama et al. 2014) alors que d'autres infectaient les deux muscles (Sabet, Tarazi, et Griffith 2020; MacVane, Crandon, et Nicolau 2014; Cheah et al. 2015). Dans le cas du modèle d'infection pulmonaire, les méthodes d'anesthésie et d'inoculation de l'inoculum variaient également. Or, **ces différences peuvent impacter les résultats obtenus et empêcher leur comparaison**. Une **standardisation des protocoles de modèles murins d'infections pulmonaires et de la cuisse semble donc nécessaire, aussi bien pour *A. baumannii* que pour les autres germes.**

C'est pourquoi l'Union Européenne a lancé le **programme IMI « AMR Accelerator »** dans le but d'**accélérer le développement d'outils et de traitements de données**, et de **renforcer la base scientifique de la recherche pour lutter contre l'antibiorésistance** (« IMI Accelerator. COMBINE Project. Availble on Https://Amr-Accelerator.Eu/about-Us/ » s. d.). Cinquante-sept partenaires européens (compagnies pharmaceutiques et universités) répartis au sein de 7 consortiums travaillent actuellement à travers une vaste série de programmes qui ont pour but de développer le vivier d'antibiotiques ou d'optimiser l'usage des antibiotiques déjà existants. Cet accélérateur comprend six projets, donc le **projet COMBINE** qui a pour principal objectif d'**accélérer les découvertes scientifiques dans le domaine de l'antibiorésistance chez les BGN,** notamment en proposant des protocoles standardisés des modèles murins infectieux (allant des souches bactériennes, à la mise au point du modèle infectieux) et en mettant à disposition une banque de données et un cadre pour l'exploitation des résultats grâce aux approches de modélisations mathématiques. Ainsi ces protocoles standardisés faciliteront l'harmonisation des données non cliniques et l'établissement de modèles d'infection standardisés de haute qualité.

Toutefois, la variabilité de l'inoculum utilisé observée dans la littérature peut s'expliquer par la **variabilité de virulence des souches d'*A. baumannii*** (A. D. Kang et al. 2018; Y.-W. Lin et al. 2018). Par exemple, Lin *et al.* ont observé que pour établir une infection pulmonaire viable chez des souris neutropéniques, l'inoculum de départ devait être plus ou moins important

(10^7 ou 10^8 UFC/souris) selon la souche d'*A. baumannii* utilisée (Y.-W. Lin et al. 2018). Lorsque les souris étaient infectées avec une souche de laboratoire, un inoculum à 10^8UFC/souris était nécessaire, alors qu'avec les deux souches cliniques utilisées, un inoculum à 10^7 UFC/souris suffisait. Une faible décroissance de 2 $\log_{10}$ UFC/souris à 6 h suivie d'une repousse en présence de CST nébulisée (à 2,64 et 5,68 mg/kg) a été observée chez les souris infectées par les souches cliniques (10^7 UFC/souris) ; alors qu'aucun effet de la CST n'a été observée chez les souris infectées par la souche de laboratoire (10^8 UFC/souris). **Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette différence d'efficacité de la CST serait due à un effet inoculum.**

Chapitre 4 : L'effet inoculum, un phénomène impactant l'efficacité des antibiotiques

I. Définition de l'effet inoculum

Les études évaluant l'efficacité des antibiotiques *in vitro* sont souvent réalisées avec un inoculum bactérien à 10^5-10^6 UFC/mL (« EUCAST: MIC determination » s. d.; « M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI » s. d.), qui n'est pas toujours représentatif des infections observées en clinique. De plus, la **densité bactérienne** (nombre de bactéries viables par g ou mL) **au site infectieux varie selon le type d'infection, de l'espèce bactérienne à l'origine de l'infection**, mais aussi **selon les individus** (Salas et al. 2020). Par exemple, des densités bactériennes comprises entre 10^3 et 10^9 UFC/mL ont été observées pour les infections abdominales, les infections des tissus mous et pour les méningites (Salas et al. 2020). Par ailleurs, la **densité bactérienne au site infectieux peut varier au cours du temps**. En cas de traitement et/ou de réponse immunitaire efficaces la densité bactérienne diminue, dans les cas contraires elle augmente. Or, **la variation de la densité bactérienne au site infectieux au cours du temps peut impacter l'efficacité des antibiotiques**. Ce phénomène microbiologique, nommé l'**effet inoculum (EI)**, désigne **une diminution de l'efficacité des antibiotiques en présence d'un fort inoculum** (Brook 1989). **Un fort inoculum peut également diminuer l'effet post-antibiotique (EPA)**, qui désigne une suppression temporaire de la croissance bactérienne après une exposition transitoire à certains antibiotiques, comme les aminosides, les ß-lactamines ou les fluoroquinolones (Mizunaga et al. 2005; « Drug detoxification dynamics explain the postantibiotic effect » 2017).

La notion d'effet inoculum a été mentionnée pour la première fois dans la littérature dans les années 1940 par plusieurs équipes. Woods *et al.* ont observé une diminution de l'efficacité du sulfanilamide en présence d'un inoculum de *Staphylococcus haemolyticus* à 10^6 UFC par rapport à son efficacité avec une densité bactérienne de 10^3 UFC (Woods 1940). D'autres, comme Cooper et Kellet et Luria, ont reporté des faits similaires avec d'autres bactéries telles que les staphylocoques en présence de sulfadiazine et pénicilline (Luria 1946; Cooper et Keller 1942). Ce phénomène peut être étudié *in vitro*, à partir de mesures de CMI, de TKC statiques,

ou d'*hollow-fibers*, ou bien *in vivo* dans des modèles animaux infectieux. Cependant, il est important de garder en mémoire, qu'**il n'existe aucun critère d'évaluation établi pour définir un EI** (Marum, Manning, et Raby 2021). Ainsi, chaque équipe établit des critères qui leur semblent opportuns pour caractériser au mieux l'EI.

II. Méthodes d'étude de l'effet inoculum

A. Mesure de la CMI

Généralement, pour mesurer l'impact de la taille de l'inoculum sur la CMI, un inoculum faible (entre 10^5 et 10^6 UFC/mL) et un inoculum 100 fois plus fort (donc 10^7 - 10^8 UFC/mL) sont utilisés (Bedenić, Beader, et Žagar 2001; Chang et al. 2018; Rio-Marques, Hartke, et Bizzini 2014; Mizunaga et al. 2005; Adler et al. 2015; Kim et al. 2020; Thomson et Moland 2001; López-Cerero et al. 2010; Harada et al. 2014).

1. Étude descriptive de la variation de la CMI en fonction de la taille de l'inoculum

Certaines équipes, comme Bedenić *et al.*, Chang *et al.* et Rio-Marques *et al.,* **n'ont pas défini de critères particuliers**, et ont uniquement observé si la CMI des antibiotiques augmentait avec un fort inoculum (10^7-10^8 UFC/mL) (Bedenić, Beader, et Žagar 2001; Chang et al. 2018; Rio-Marques, Hartke, et Bizzini 2014).

Par exemple, Bedenić *et al.*, ont étudié l'impact de la taille de l'inoculum de différentes souches de *K. pneumoniae* (à 10^5 et 10^7 UFC/mL), produisant des BLSE ou non de type SHV, sur la CMI de divers ß-lactamines (ceftazidime, céfotaxime, ceftriaxone aztreonam, cefpirome et céfépime) (Bedenić, Beader, et Žagar 2001). Un EI a été observé uniquement avec les souches de *K. pneumoniae* produisant une BLSE, avec une augmentation de la CMI allant d'un facteur 2 à un facteur supérieur à 1024 selon la souche et l'antibiotique considérés. De façon intéressante, il a été observé que pour un même antibiotique, l'EI observé différait d'une souche à l'autre. Par exemple, avec l'inoculum à 10^5 UFC/mL, 23,8 %, 60 % et 100 % des souches produisant respectivement une BLSE de type SHV-2, SHV-5 et SHV 12 étaient sensibles au cefpirome. Lorsqu'un inoculum à 10^7 UFC/mL était utilisé, seuls 9,52%, 40% et 0% de ces

souches étaient sensibles à ce même antibiotique. De même, l'EI observé avec une même souche différait selon l'antibiotique utilisé.

D'autres ont choisi comme critère d'évaluation**, une augmentation de la CMI d'un facteur de 4** (Mizunaga et al. 2005) **ou d'un facteur 8** (Adler et al. 2015; Kim et al. 2020; Thomson et Moland 2001; López-Cerero et al. 2010; Harada et al. 2014) **entre les deux inocula**. Ainsi, dans l'étude de Harada *et al.*, un EI a été démontré pour des souches cliniques de *K. pneumoniae* produisant des BLSE avec une augmentation d'un facteur 64 de la CMI moyenne du céfépime entre les deux inocula testés (10^5 et 10^7 UFC/mL) (Harada et al. 2014).

2. Caractérisation de la relation entre la CMI et la taille de l'inoculum par des approches mathématiques

L'augmentation de la CMI en fonction de la taille de l'inoculum peut être décrite comme illustrée par la Figure 32. Ainsi aux plus faibles inocula la CMI est constante, c'est la CMI de base, jusqu'à atteindre un inoculum seuil à partir duquel la CMI ne cesse d'augmenter. Ainsi le choix de l'inoculum testé par rapport à l'inoculum choisi comme référence aura un impact sur l'interprétation des résultats (R. C. Li et Ma 1998). Par exemple, comme illustré sur la Figure 32, si les deux inocula testés sont inférieurs à l'inoculum seuil, on conclura qu'il n'y a aucun EI. Alors que si ces inocula sont situés de part et d'autre de l'inoculum seuil, un EI sera observé. Par ailleurs, cette variation de la CMI en fonction de l'inoculum de départ peut être aussi dépendante du couple bactérie/antibiotique étudié. C'est pour cela que le taux d'augmentation de la CMI par rapport à l'augmentation de la taille de l'inoculum ne peut être une valeur universelle. **Afin de s'affranchir de ce manque d'harmonisation, des approches mathématiques ont été utilisées afin de caractériser la relation entre la CMI et la taille de l'inoculum.**

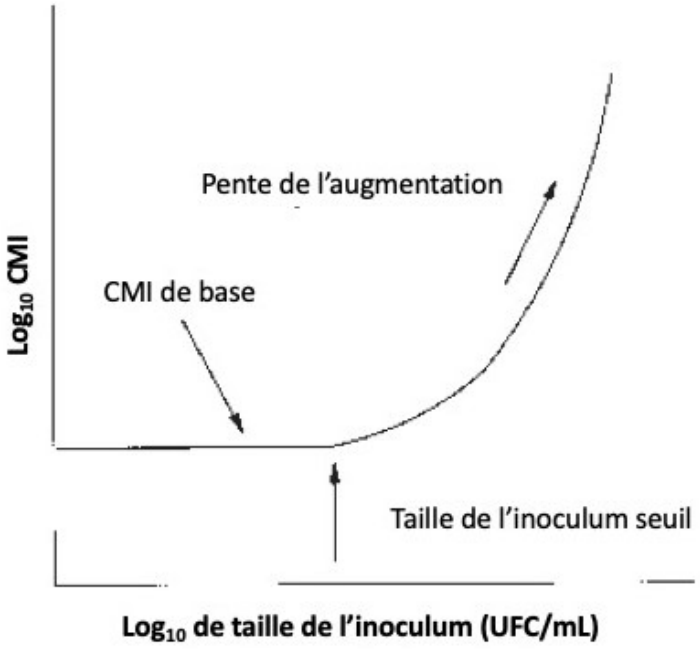


Figure 32. Schéma des paramètres fondamentaux pour la définition d'un effet inoculum à partir de la CMI – Traduit de (Li and Ma 1998)

Par exemple, Li et Ma, ont tenté de caractériser la relation entre la CMI de quatre aminosides (tobramycine, gentamicine, amikacine et streptomycine) et la taille de l'inoculum de *S. aureus* et *E. coli* (10^3-10^8 UFC/mL et de 10^4-10^9 UFC/mL, respectivement) (R. C. Li et Ma 1998). Comme illustré sur la Figure 33, aux plus faibles inocula (10^3-10^4 et 10^4-10^5 UFC/mL respectivement pour *S. aureus* et *E. coli*), la CMI était constante, puis augmentait de manière exponentielle aux plus forts inocula (10^5-10^8 et 10^5-10^9 UFC/mL respectivement pour *S. aureus* et *E. coli*). Cette augmentation de la CMI a été caractérisée selon l'équation suivante (Équation 1) (R. C. Li et Ma 1998) :

$$Log\ (CMI) = \log CMI_0 + (e^{k\times(logI - logI_{tr})} - 1) \qquad \text{(Équation 1)}$$

Où, CMI_0 correspond à la CMI de base au plus faible inoculum testé, k la constante décrivant le taux d'augmentation de la CMI (en $\log_{10}$) en fonction de la taille de l'inoculum testé ($logI$) et I_{tr}, l'inoculum seuil à partir duquel la CMI augmente brusquement de façon exponentielle.

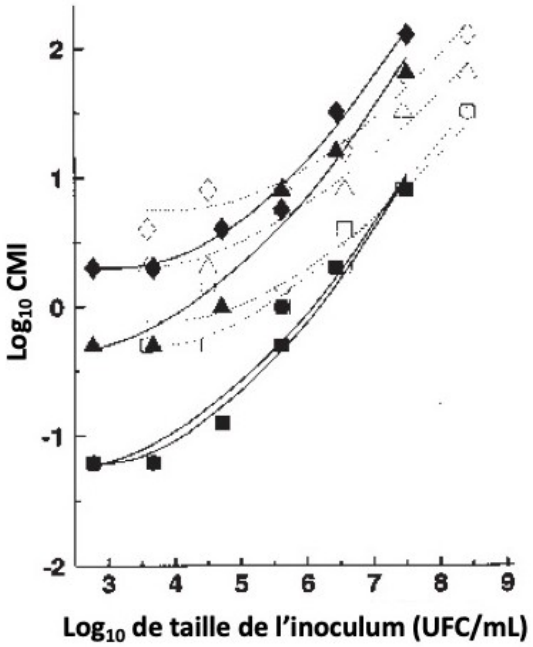


Figure 33. Augmentation de la CMI des différents antibiotiques testés en fonction de la taille de l'inoculum d'*E. coli* (symboles blancs) et *S. aureus* (symboles noirs). Les lignes pleines représentent les simulations du modèle pour *E. coli*, et les lignes en pointillées celle obtenues pour *S. aureus* – Traduit de R. C. Li and Ma 1998)

D'autres ont caractérisé la relation entre la taille de l'inoculum d'une souche de *S. aureus* et la CMI d'antibiotiques appartenant à différentes classes à partir d'un modèle E_{max} : (Équation 2) (Udekwu et al. 2009) :

$$M(D) = M_{min} + pd\ (M_{max}\frac{D}{D+k_M}) \qquad \text{(Équation 2)}$$

Où, $M(D)$ correspond à la CMI des antibiotiques en fonction de la densité bactérienne (D), M_{min} correspond à la CMI minimale et M_{max} la CMI maximale, k_M la densité bactérienne pour laquelle la CMI est égale à 50% de sa valeur maximale, et pd le coefficient caractérisant l'EI (avec $0 < pd < 1$).

Pour aller plus loin, d'autres auteurs ont **comparé différents modèles mathématiques afin de caractériser au mieux l'EI** observé avec un plus grand nombre de combinaisons bactérie/antibiotique (Salas et al. 2020). L'impact de la taille de l'inoculum *in vitro* (10^1-10^{12} UFC/mL) de BGN (*E. coli*, *Salmonella enterica* non typhique subsp. *enterica*) et de BGP (*S.*

pneumoniae et *S. aureus)* sur l'activité de ß-lactamines (oxacilline et ceftriaxone), de fluoroquinolones (ciprofloxacine), aminoside (gentamicine), glycopeptides (vancomycine) et oxazolidinone (linézolide) a été étudié. L'évolution des CMI exprimée en $\log_2$ ($\log_2$ CMI) en fonction des différents inocula exprimés en $\log_{10}$ ($\log_{10}$ UFC/mL) a été décrite par des modèles mathématiques tels que l'équation de Michaelis-Menten, l'équation de Hill, le modèle logistique, le modèle de Gompaertz, le modèle de von Bertalanffy ou encore le modèle exponentielont été classés selon l'ajustement des données obtenue. Les courbes illustrant la relation entre la CMI et la densité bactérienne (10^1-10^{12} UFC/mL) différaient selon le modèle mathématique utilisé (Figure 34). Pour la plupart des combinaisons bactérie/antibiotique les modèles logistique (Salas et al. 2020), de Gompaertz (M. Peleg et Corradini 2011) et de von Bertalanffy (Fabens 1965) décrivaient le mieux cette relation entre la CMI et la taille de l'inoculum.

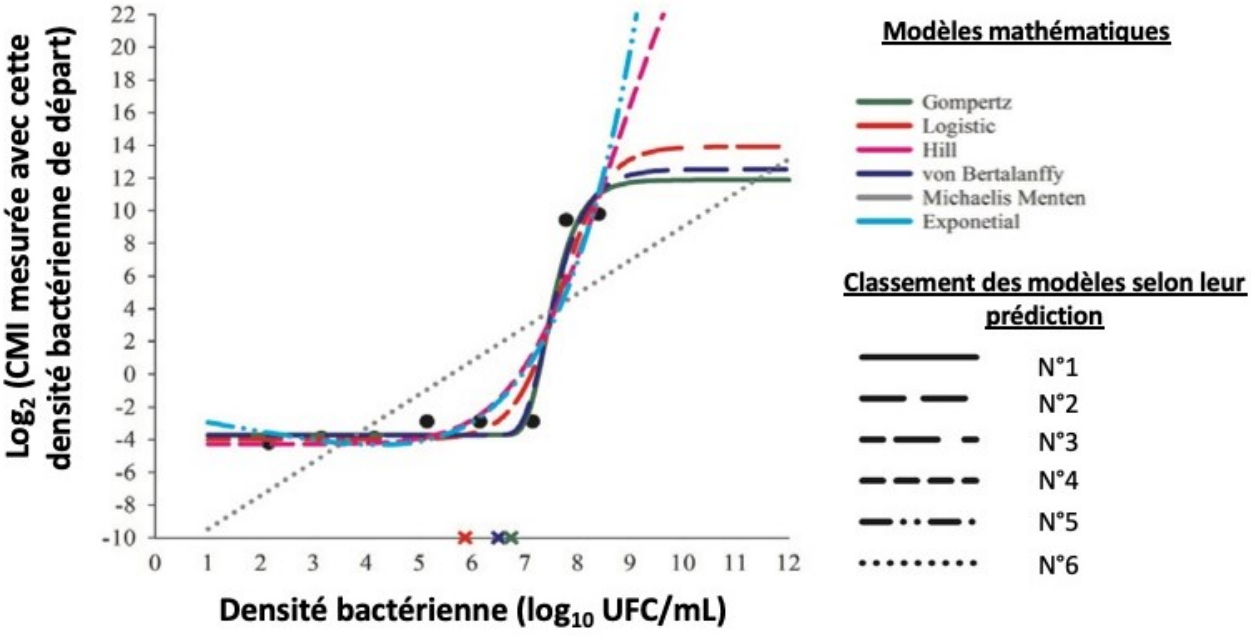


Figure 34. Exemple de prédictions des modèles mathématiques obtenues pour la caractérisation de la relation entre la CMI de la gentamicine ($\log_2$ (CMI)) et la densité bactérienne ($\log_{10}$ (UFC/mL)) *de S. aureus*. Les données expérimentales des CMI sont représentées par des cercles noirs et les prédictions par des lignes de couleur. Le modèle ayant prédit le mieux les données expérimentales est représenté par une ligne pleine ; les prédictions des autres modèles sont représentées par ordre décroissant par des lignes en pointillés. La croix montre la densité bactérienne seuil correspondant au point d'inflexion de la courbe d'augmentation de la CMI prédite par les 3 meilleurs modèles. – D'après (Salas et al. 2020)

Comme observé précédemment (R. C. Li et Ma 1998), la CMI était quasi constante aux faibles inocula et augmentait lorsqu'un inoculum seuil était atteint ; l'inoculum seuil variait d'un couple bactérie/antibiotique à l'autre (Salas et al. 2020).

B. Time-kill curves statiques

Tout comme pour les CMI, l'EI peut être évalué par des études descriptives à l'aide de TKC statiques (Burgess et Hall 2004; López-Cerero et al. 2010; Harada et al. 2014; Mizunaga et al. 2005), mais aussi par des approches mathématiques (Bhagunde et al. 2010; Bulitta et al. 2009; 2010; E. I. Nielsen et al. 2017).

1. Étude descriptive de la variation de l'effet des antibiotiques au cours du temps en fonction de la taille de l'inoculum

L'effet inoculum est souvent étudié à partir de TKC avec deux inocula de tailles différentes soit 10^5 et 10^7 UFC/mL (Burgess et Hall 2004; López-Cerero et al. 2010; Harada et al. 2014) ou 10^6 et 10^8 UFC/mL (Mizunaga et al. 2005). Dans ces études, **l'EI est caractérisé par la variation de de bactéricidie au cours du temps entre les différents inocula testés**. Par exemple, dans une étude il a été montré que l'activité du méropénème n'était pas impactée par la taille de l'inoculum (5 x 10^5 et 10^7 UFC/mL) de souches de *K. pneumoniae* ne produisant pas des BLSE, alors que son activité était diminuée en présence du fort inoculum de souches de *K. pneumoniae* produisant des BLSE (Burgess et Hall 2004). Une diminution de la densité bactérienne de 4 $\log_{10}$ UFC/mL sans aucune repousse était observée avec les deux inocula des souches ne produisant pas de BLSE. Avec les souches produisant des BLSE, une décroissance de 4 $\log_{10}$ UFC/mL sans aucune repousse était observée avec le plus faible inoculum, alors qu'avec le plus fort inoculum, une décroissance de 3 $\log_{10}$ UFC/mL suivie d'une repousse était obtenue.

2. Caractérisation de la relation entre l'efficacité des antibiotiques *in vitro* et la taille de l'inoculum par des approches mathématiques

L'EI *in vitro* peut être caractérisé aussi à l'aide de modèles mathématiques empiriques.

Lors de l'étude de l'impact de la taille de l'inoculum d'une souche de référence d'*E. coli* sur l'activité *in vitro* de la pipéracilline, une diminution de l'efficacité de l'antibiotique avec un fort inoculum (10^8 UFC/mL) par rapport à un inoculum plus faible (10^5 UFC/mL) a été observée au cours de TKC statiques (Bhagunde et al. 2010). Les données ont été ensuite décrites à l'aide d'un **modèle empirique** prenant en compte la **diminution de la concentration efficace en antibiotique avec l'augmentation de la taille de l'inoculum initial** selon l'équation suivante (Équation 3) :

$$C_{eff}(t) = \left(1 - \frac{N(0)^Q}{N(0)^Q + N_{50}^Q}\right) \times C(t) \qquad \text{(Equation 3)}$$

Où, $C_{eff}(t)$ correspond à la concentration efficace en antibiotique à l'instant t, N_0, la concentration bactérienne au début de la TKC, Q, le coefficient de sigmoïdicité. N_{50} correspond à la concentration bactérienne à laquelle 50% de la concentration en antibiotique est réellement efficace, et $C(t)$, la concentration en antibiotique à l'instant t.

D'autres ont caractérisé l'EI avec de modèles semi-mécanistiques plus ou moins complexes (E. I. Nielsen et al. 2017; Bulitta et al. 2009; 2010)**.**

Un modèle PKPD (Figure 35) a été développé afin de décrire l'effet de la ciprofloxacine contre différents inocula (10^6-10^9 UFC/mL) d'*E. coli* (E. I. Nielsen et al. 2017). **Ce modèle PKPD comprend 2 sous-populations bactériennes (sensibles ou résistantes) et pour chacune de ces deux sous-populations, les bactéries peuvent se présenter sous 3 états physiologiques différents** : (i) un état dans lequel les bactéries se multiplient et sont sensibles à la ciprofloxacine (S) ; (ii) un état dans lequel les bactéries sont en dormance (ne se multiplient pas) et sont insensibles à l'antibiotique (R) ; et enfin (iii) un état où elles sont sensibles à l'antibiotique, mais dont la croissance est interrompue et où elles ne peuvent pas former de colonies (Nc). Dans chaque sous-population, les bactéries S se multiplient selon leur vitesse de croissance respective k_{growth}, et toutes les bactéries meurent selon la constante de mort naturelle k_{death} (identique pour toutes les bactéries quel que soit leur état physiologique). Les bactéries peuvent passer d'un état S à un état Nc de manière réversible (selon les constantes

de vitesse k_{NcS} et k_{SNc}), mais de façon irréversible d'un état S à un état R (selon la constance de vitesse k_{SR}). Dans ce modèle, le transfert de l'état S à l'état R est proportionnel à la densité bactérienne initiale. Ainsi, plus la densité est élevée, plus le transfert de l'état S à l'état R est important, moins la ciprofloxacine est efficace.

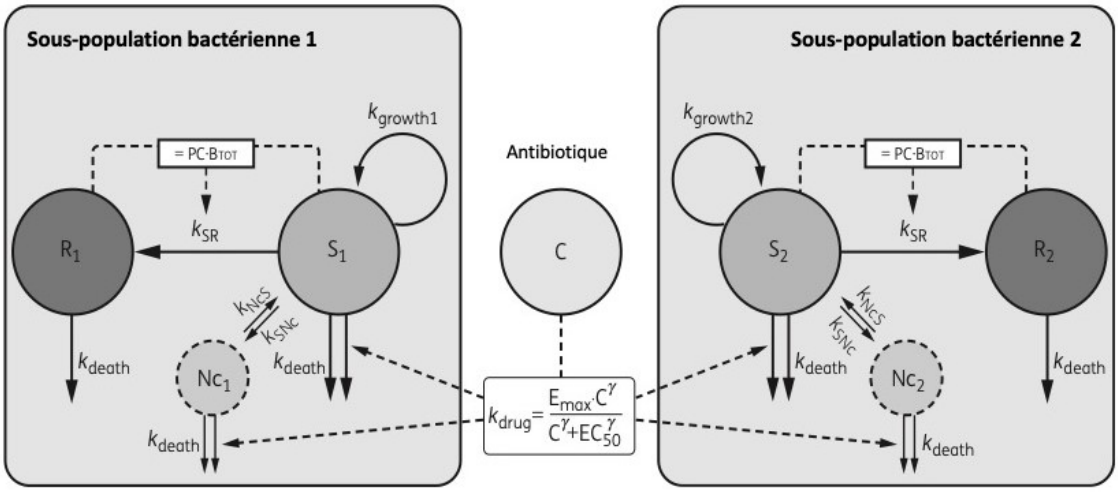


Figure 35. Schéma du modèle PKPD utilisé par Nielsen *et al.* pour la caractérisation de l'EI d'*E. coli* sur l'activité *in vitro* de la ciprofloxacine. – D'après (E. I. Nielsen et al. 2017)

D'autres ont caractérisé l'EI à l'aide d'un **modèle semi-mécanistique PKPD prenant en compte le *quorum sensing*** (Bulitta et al. 2009). Lors de TKC statiqus avec des inocula de départ allant de 10^6 à 10^8 UFC/mL, un EI sur l'activité de la ceftazidime (1 à 64 mg/L) a été observé avec plusieurs souches (de référence et clinique) de *P. aeruginosa*. Des concentrations ≥ 4 mg/L conduisaient à une diminution de la densité bactérienne de 3 à 4 $\log_{10}$ UFC/mL à 24 h avec inoculum de départ à 10^6 UFC/mL alors qu'une diminution de 1,6 et <0,3 $\log_{10}$ UFC/mL étaient observées avec un inoculum de départ à 10^7 et 10^8 UFC/mL, respectivement. Les auteurs ont développé un modèle semi-mécanistique complexe afin de décrire la modification de l'activité *in vitro* de la ceftazidime en fonction de la taille de l'inoculum de *P. aeruginosa* (Figure 36). Ce modèle repose sur le mécanisme du *quorum sensing*, mécanisme de communication entre bactéries. Ce modèle caractérise l'EI par une augmentation de la concentration du milieu extracellulaire en auto-inducteurs en présence d'une forte densité bactérienne qui va induire des changements phénotypiques au niveau de la membrane des bactéries et ainsi inhiber

l'action de la ceftazidime. Ce modèle a été utilisé par la suite pour caractériser l'EI de *P. aeruginosa* sur l'activité *in vitro* de la colistine (Bulitta et al. 2010).

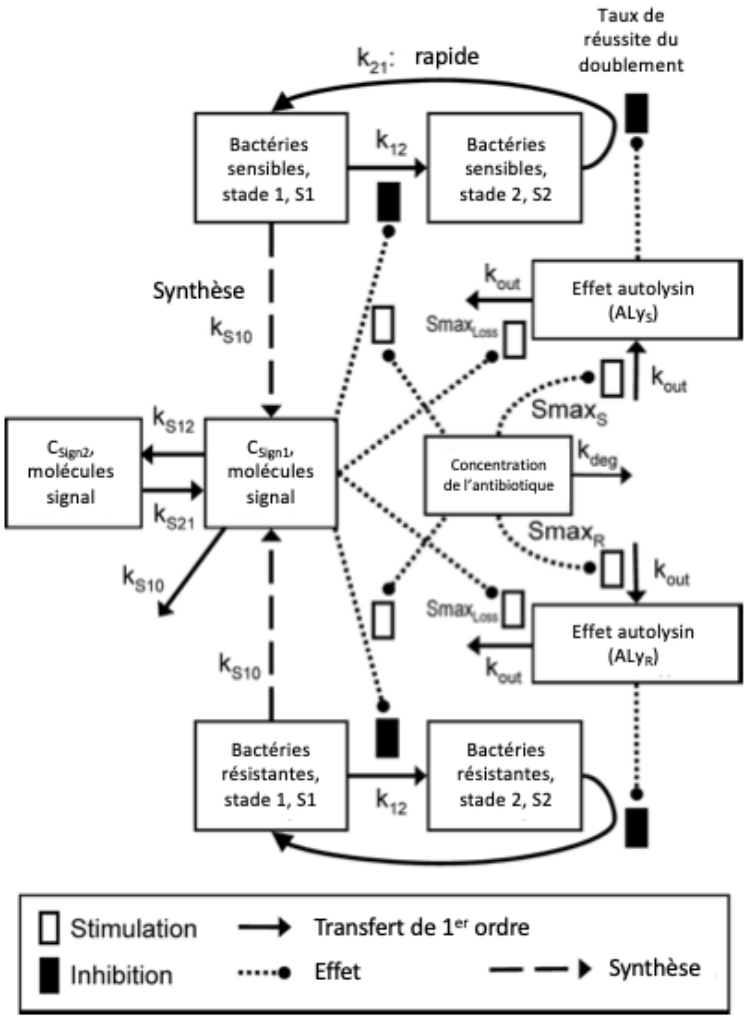


Figure 36. Schéma du modèle PKPD utilisé par Bulitta *et al.* pour la caractérisation de l'EI de *P. aeruginosa* sur l'activité *in vitro* de la ceftazidime – D'après (Bulitta et al. 2009)

C. Les *hollow*-fibers

Les études visant à étudier l'EI par la méthode des *hollow-fibers,* sont peu nombreuses et ne sont que descriptives (Marum, Manning, et Raby 2021; Broussou et al. 2019). Ces études ont permis de mettre en évidence **l'intérêt de cette méthode notamment en cas d'expérimentation avec un fort inoculum**.

Dans une étude *in vitro,* l'efficacité la combinaison amikacine/vancomycine contre 2 inocula d'une souche de référence de *S. aureus* a été étudiée à l'aide de TKC statiques sur 24 h et TKC dynamiques sur 5 j par la méthode d'*hollow-fibers* (Broussou et al. 2019). Il en résulte qu'en présence du faible inoculum (5 x 10^5 UFC/mL), aucune différence de bactéricidie n'a été observée entre les deux méthodes de TKC à 24 h. En effet, un effet bactéricide à 24h, c'est-à-dire une diminution de 3 $\log_{10}$ UFC/mL, a été observé lors des TKC statiques et des *hollow-fibers*. Cependant, en présence du fort inoculum (10^9 UFC/mL), des différences d'effet de la combinaison ont été observées. A 24 h, lors des TKC statiques, la population bactérienne était réduite de 3 $\log_{10}$ UFC/mL, alors qu'avec les *hollow-fibers*, une décroissance d'1 $\log_{10}$ UFC/mL environ était obtenue. Au bout des 5 j d'expérimentation avec les *hollow-fibers*, une décroissance de 5 $\log_{10}$ UFC/mL était observée. Cela montre donc que les ***hollow-fibers*** **constitueraient une méthode d'étude intéressante pour l'étude de l'EI *in vitro* sur une durée plus importante que les TKC statiques (24-30 h)**.

Cependant, une seconde étude a montré qu'**il semblerait que les réglages utilisés pour simuler la PK des antibiotiques lors des *hollow-fibers* pourraient influencer les résultats obtenus lors de l'étude de l'EI** (Marum, Manning, et Raby 2021). Dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse que le débit utilisé pour simuler une clairance importante pourraient impacter l'étude de l'impact de la taille de l'inoculum sur l'activité des antibiotiques. Les déchets et les molécules produits par les bactéries présents dans le milieu extracellulaire peuvent induire des changements métaboliques associés à la résistance aux antibiotiques (Bulitta et al. 2009; 2010). Or, ci ces derniers ont la capacité de passer à travers les fibres creuses du compartiment périphérique, un important débit pourrait entrainer une élimination des déchets et des molécules au niveau du compartiment périphérique et empêcher ainsi les changements métaboliques induit par les déchets et molécules produits pas les bactéires. Cela suggère que les *hollow-fibers* seraient une méthode *in vitro* plus adaptée pour l'étude de l'EI avec des antibiotiques à faible clairance totale afin de conserver les phénomènes microbiologiques (appauvrissement nutritionnel du milieu, accumulation des déchets et métabolites du milieu extracellulaire) qui pourraient jouer un rôle dans l'EI.

D. Modèles expérimentaux animaux

Différents modèles animaux comme le modèle murin d'infection de la cuisse (D.-G. Lee et al. 2013; Ferran et al. 2009; Maglio et al. 2004; 2005), le modèle murin de péritonite (Fantin et al. 2019), le modèle murin d'infection pulmonaire (Harada et al. 2014; Lhermie et al. 2015), le modèle murin de bactériémie (Mizunaga et al. 2005) ou encore le modèle d'infection pulmonaire chez le rat (Kesteman et al. 2009), **ont été utilisés pour l'étude de l'EI *in vivo* selon différentes approches.**

Certains ont réalisé des études de survie pour étudier l'EI *in vivo* (Mizunaga et al. 2005; Harada et al. 2014; Kesteman et al. 2009). Par exemple, l'EI de *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur l'activité *in vivo* de fluoroquinolones (pazufloxacine et ciprofloxacine) et de carbapénèmes (imipénème, panipénème et méropénème) a été évalué dans un modèle murin de bactériémie (Mizunaga et al. 2005). Une étude de survie sur 7 j a été réalisée avec des souris ayant été infectées par *P. aeruginosa* (10^5 ou 10^7 UFC/souris) ou par *S. aureus* (10^7 ou 10^9 CFU/souris) traitées avec différentes doses de ces antibiotiques. Dans cette étude le paramètre utilisé pour comparer l'efficacité des antibiotiques entre les deux inocula est la dose efficace chez 50% des animaux (ou ED_{50}). L'ED_{50} correspond à la dose où 50% du nombre total d'animaux de départ survivent à l'issue des 7 j. Il en résulte que la taille de l'inoculum des deux pathogènes exerçait une influence plus marquée sur l'efficacité *in vivo* des carbapénèmes que sur celles des fluoroquinolones. Dans le modèle infectieux à *S. aureus*, les ED_{50} des carbapénèmes étaient augmentées de manière significative (900-1000 fois) en présence du plus fort inoculum, alors que celles des fluoroquinolones n'ont augmenté que d'un facteur 20-28. Dans le cas du modèle infectieux à *P. aeruginosa*, les ED_{50} des carbapénèmes au plus fort inoculum n'ont pas pu être calculées à partir des doses testées. Les ED_{50} des fluoroquinolones étaient augmentées d'un facteur 11-23 en présence du plus fort inoculum de *P. aeruginosa*.

La **mesure de l'effet PD des antibiotiques à 24 h ou 48 h (via les dénombrements bactériens à partir des tissus infectés) peut être utilisée comme paramètre pour caractériser l'EI *in vivo*** (D.-G. Lee et al. 2013; Fantin et al. 2019; Maglio et al. 2004; 2005; Ferran et al. 2009). Par exemple, Lee *et al.* ont étudié l'efficacité de différents antibiotiques (ceftobiprole, daptomycine, linézolide et vancomycine) sur 24 h dans un modèle murin neutropénique

d'infection de la cuisse avec plusieurs souches de *S. aureus* et de *S. pneumoniae* (D.-G. Lee et al. 2013). Dans cette étude, **« l'index EI » a été déterminé pour évaluer l'importance de l'EI** de chaque souche bactérienne sur les 4 antibiotiques. Différentes doses uniques de chaque antibiotique ont été administrées 2 h après que les souris aient été infectées avec un inoculum différent (10^5 ou 10^7 UFC/cuisse) dans chaque cuisse. Lles cuisses infectées ont été prélevées afin de réaliser un comptage bactérien 24 h après l'initiation de l'antibiothérapie. Ces données ont été utilisées pour calculer la dose statique de chaque antibiotique (en mg/kg/j) pour chaque inoculum, c'est-à-dire la dose permettant d'obtenir aucune variation à 24 h de la charge bactérienne par rapport au début du traitement antibiotique. L'index EI a été calculé avec le ratio $\frac{Dose\ statique\ au\ fort\ inoculum}{Dose\ statique\ au\ faible\ inoculum}$. Un faible EI a été observé avec les deux bactéries avec le ceftobiprole comparé aux trois autres antibiotiques testés. De plus, aucune différence significative était observée entre les souches de *S. aureus* et *S. pneumoniae* puisque leur index EI moyen respectifs étaient de 2,9 ± 1,2 et de 2,5 ± 0,8 avec le ceftobiprole. *A contrario*, avec la vancomycine l'EI de *S. aureus* était plus marqué que celui de *S. pneumoniae* avec des index EI respectifs de 10,1 ± 4,7 et de 1,5 ± 1,1.

D'autres ont comparé les index PK/PD obtenus avec les différents inocula testés (Maglio et al. 2004; 2005; Fantin et al. 2019; Ferran et al. 2009). Par exemple, l'étude de l'impact de la taille de différentes souches d'*E. coli* vis-à-vis de la CST a été évaluée dans un modèle murin de péritonite (Fantin et al. 2019). La CMI de la CST a été mesurée avec différents inocula (de 10^3 à 10^7 UFC/mL). Puis les index PK/PD de la CST, c'est-à-dire *f*$AUC_{0\text{-}24\ h}$/CMI, ont été calculés pour chaque inoculum après une étude PK plasmatique de la CST dans le modèle murin de péritonite à *E. coli*. Il a été ainsi montré que l'index *f*$AUC_{0\text{-}24\ h}$/CMI était diminué aux plus forts inocula. Par exemple, pour l'une des souches utilisées, le ratio *f*$AUC_{0\text{-}24\ h}$/CMI était de 8.19 et 7.17 avec un inoculum à 10^5 et à 10^7 UFC, respectivement.

Pour caractériser l'EI les vitesses de bactéricidie des antibiotiques peuvent être comparées (D.-G. Lee et al. 2013). Par exemple, Lee *et al.* ont étudié l'efficacité de la vancomycine sur 24 h dans un modèle murin neutropénique d'infection de la cuisse avec une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline à 10^5 et 10^7 UFC/cuisse. Des comptages bactériens ont été réalisés à partir des cuisses prélevées à différents temps post-traitement à la vancomycine ou au

sérum physiologique (2, 4, 6, 8, 12, 14, 18 et 24 h) afin déterminer à l'aide d'une régression linéaire les vitesses de croissance et de bactéricidie *in vivo* (exprimées en $\log_{10}$ UFC/cuisse/h). La différence entre ces deux vitesses a permis de caractériser l'EI de *S. aureus* vis-à-vis de la vancomycine pour chaque schéma posologique testé. Par exemple, il a été ainsi montré qu'avec une administration sous-cutanée d'une dose de 12,5 mg/kg de vancomycine toutes les 6 h, la différence de vitesses était de -0,028 $\log_{10}$ UFC/cuisse/h (ce qui correspond à une éradication) au faible inoculum, alors qu'au plus fort inoculum, la différence de vitesses était de 0,080 $\log_{10}$ UFC/cuisse/h. Cette différence de vitesses entre les deux inocula était atténuée à la plus forte dose testée (200 mg/kg toutes les 6h) avec des différences de vitesses de -0,088 $\log_{10}$ UFC/cuisse/h et de -0,060 $\log_{10}$ UFC/cuisse/h à un inoculum de 10^5 et 10^7 UFC/cuisse, respectivement.

III. L'EI, un phénomène dont les origines sont multiples

L'EI étant un phénomène dépendant du couple antibiotique/souche bactérienne étudié (Bedenić, Beader, et Žagar 2001; R. C. Li et Ma 1998; Salas et al. 2020; Burgess et Hall 2004; Mizunaga et al. 2005; Harada et al. 2014; D.-G. Lee et al. 2013)**, les hypothèses concernant les mécanismes à l'origine du phénomène de l'EI sont multiples.**

A. Un déséquilibre entre le nombre de molécules d'antibiotique et nombre de bactéries

L'une des hypothèses les plus simples énoncées dans la littérature pouvant expliquer l'EI, est **la diminution de nombre de molécules d'antibiotique disponible par bactérie**. En effet, pour une même concentration d'antibiotique, le nombre de molécules disponibles avec un inoculum à 10^6 UFC/mL, par exemple, est plus important qu'avec un inoculum à 10^8 UFC/mL (Udekwu et al. 2009; Baeder et Regoes 2019).

B. La production de ß-lactamases

Comme nous l'avons vu précédemment la **production d'enzymes bactériennes telles que les ß-lactamases a un rôle important dans l'EI** (Bedenić, Beader, et Žagar 2001; Burgess et Hall 2004). En effet, un EI sur la CMI de divers ß-lactamines avait été observé uniquement avec les souches de *K. pneumoniae* produisant une BLSE (Bedenić, Beader, et Žagar 2001). De même, l'activité du méropénème était impactée par la taille de l'inoculum, uniquement lorsque des

souches de *K. pneumoniae* produisant des BLSE étaient utilisées. Ces résultats suggèrent donc que **la diminution de l'activité des ß-lactamines serait due à une concentration extracellulaire en BLSE plus importante en lien avec un nombre de bactéries plus important aux forts inocula**.

C. Une fixation aux cibles présentes dans le milieu extracellulaire

Dans certains cas **les molécules présentes dans le milieu extracellulaire peuvent modifier l'efficacité des antibiotiques en présence d'un fort inoculum**. Par exemple, Yokota *et al.*, ont montré que les LPS présents dans le surnageant de culture pouvait entrainer une diminution de l'efficacité de la CST (Yokota et al. 2018). Dans un premier temps, ils ont observé un EI sur la CMI de la CST avec des souches de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *A. baumannii*, avec un EI plus important pour *P. aeruginosa*. Les quantités de LPS, protéines et acides nucléiques présents dans le surnageant de culture de ces trois espèces ont été mesurés après filtration pour d'identifier l'origine de cette différence d'EI. Le surnageant de culture de *P. aeruginosa* contenait des quatnités nettement plus élevées de LPS, de protéines et d'acides nucléiques que celui d'*E. coli* et d'*A. baumannii*. Afin d'identifier quelle molécule était impliquée dans la diminution de l'efficacité de la CST, la CMI de la CST contre une souche *E. coli* a été mesurée en présence de trois composants extracellulaires majeurs du surnagent de culture de *P. aeruginosa* (alginate, l'ADN et le LPS). La CMI de la CST en présence de LPS passait de 1 à 128 µg/mL. L'ADN n'avait qu'un faible effet sur la CMI de la CST avec une augmentation de la CMI 1 à 2 µg/mL. L'alginate n'avait aucun effet sur la CMI. Ces résultats ont été confirmés par la diminution de l'activité de la CST *in vitro* lors de TKC statiques en présence de LPS à 5 et 50 µg/mL. Dans cette étude, une augmentation de la CMI d'aminosides (amikacine, gentamycine et tobramycine) a été également observée en présende de LPS à 500 µg/mL. Cela suggère que **l'activité des antibiotiques cationiques, tels que les polymyxines et les aminosides, peut être diminuée en raison de leur fixation aux LPS/LOS des bactéries vivantes et mortes, mais aussi aux LPS/LOS présents dans le milieu extracellulaire**. Ainsi, une quantité importante de LPS en lien avec une densité bactérienne importante aux sites infectieux pourrait affecter l'efficacité de ces antibiotiques.

D. Une population bactérienne hétérorésistante

D'autres ont attribué l'EI à une hétérorésistance de la population bactérienne. La probabilité d'avoir une sous-population résistante dans l'inoculum de départ est plus importante avec les forts inocula (Ferran et al. 2009; Kesteman et al. 2009). Ainsi, une densité bactérienne importante pourrait favoriser la sélection de mutants, notamment en cas d'utilisation d'une concentration en antibiotique inférieure à la concentration prévenant les mutants (CPM). Or, comme illustré par la Figure 37, en l'absence d'antibiotique ou en présence de concentrations inférieures à la CMI des bactéries sensibles, les mutants résistants représentent une faible proportion de la population bactérienne (N. Zhang et al. 2017; Cantón et Morosini 2011). Lorsque la concentration en antibiotique est supérieure à la CMI, la sous-population sensible est réduite au profit de la sous-population résistante, jusqu'à atteindre une concentration en antibiotique où aucune sous-population n'est résistante ; c'est la concentration prévenant les mutants (CPM). La CMI et la CPM définissent les limites de la fenêtre de sélection des mutants (FSM), c'est-à-dire, la gamme des concentrations en antibiotique où seule la sous-population résistante est sélectionnée.

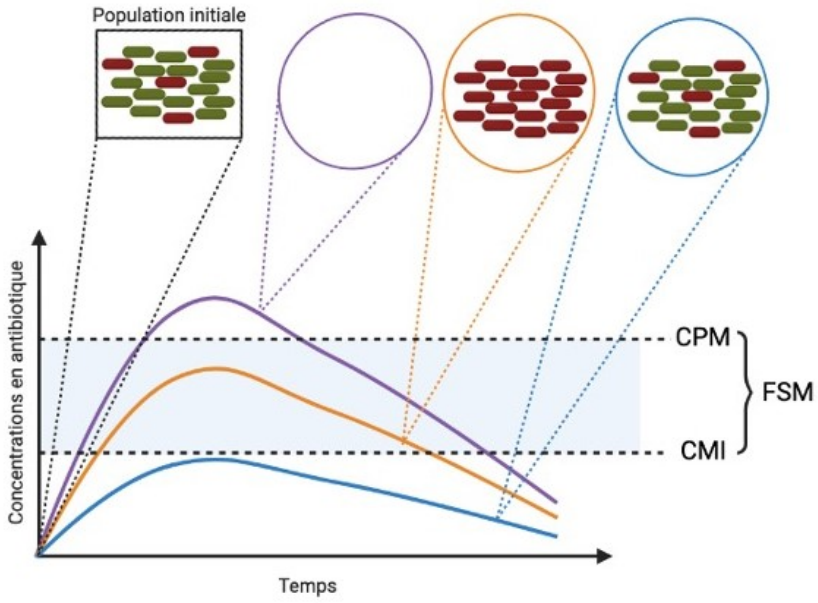


Figure 37. Schéma de la fenêtre de sélection des mutants – D'après (Cantón and Morosini 2011), Créé avec Biorender.com

Par exemple, à partir d'un modèle murin neutropénique d'infection de la cuisse à *E. coli*, il a été montré qu'en cas d'infection avec un fort inoculum (10^8 UFC/souris contenant 10^2 UFC/souris bactéries résistantes), après 48 h post-traitement à la marbofloxacine à 20 mg/kg, les clones isolés étaient tous résistants à cet antibiotique (Ferran et al. 2009). Tandis que chez les souris infectées avec un plus faible inoculum (10^6 UFC/souris sans bactéries résistantes), aucun clone résistant n'a été identifié. Les souris traitées avec des doses répétées de marbofloxacine, présentaient une proportion de bactéries résistantes moins importante que celles traitées par dose unique. Ce qui suggère que le maintien des concentrations en antibiotiques hors de la FSM, c'est-à-dire supérieures à la CPM, est important pour la réussite du traitement. Cela a été également observé dans une seconde étude évaluant la PK/PD de la marbofloxacine *in vivo* dans modèle murin d'infection pulmonaire à *K. pneumoniae* chez le rat (Kesteman et al. 2009).

E. La production de biofilms bactériens

Pour expliquer la diminution de concentration efficace de pipéracilline en fonction de la taille de l'inoculum initial d'*E. coli*, Bhagunde *et al.* ont émis l'hypothèse **qu'en présence d'un fort inoculum, la formation de biofilm bactérien était plus importante** (Bhagunde et al. 2010). Ils ont donc évalué, en parallèle de l'étude de l'EI, la capacité de la souche d'*E. coli* utilisée à former des biofilms sur 24h dans des conditions contrôles (sans antibiotique) à un inoculum initial à 10^5 et à 10^8 UFC/mL. En présence d'une forte densité bactérienne initiale, la biomasse observée à la fin de l'expérience était plus importante que celle obtenue avec une plus faible densité bactérienne initiale (10^5 UFC/mL). Comme mentionné dans le chapitre I, les biofilms peuvent diminuer l'efficacité des antibiotiques en limitant leur accès aux bactéries, ce qui pourrait expliquer l'EI observé au cours de cette étude.

F. La modification de l'expression des cibles des antibiotiques

Lors de l'étude de l'impact de la taille de l'inoculum de souches d'*E. coli*, produisant ou non des BLSE, vis-vis la combinaison pipéracilline/tazobactam et de l'amoxicilline/acide clavulanique, un EI *d'E. coli* avait été observé uniquement sur l'activité de la combinaison pipéracilline/tazobactam (López-Cerero et al. 2010). Ce qui suggère que, dans ce cas, l'EI n'est pas lié à la production de ß-lactamases puisque l'activité de la combinaison

amoxicilline/clavunate restait inchangée quel que soit l'inoculum de départ. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que cet **EI serait dû à une modification de l'expression des protéines cibles**. En effet, l'amoxicilline cible les protéines liant les pénicillines (PLPs) PLP1A et PLP2, alors que la pipéracilline cible préférentiellement les PLP2 et PLP3. Or, il a été montré que l'expression de la PLP3 diminuait fortement durant la phase stationnaire de croissance (celle des deux autres PLPs restant inchangée) (Aedo, Orman, et Brynildsen 2019). Cela pourrait donc expliquer l'EI observé sur la pipéracilline, puisque la phase stationnaire est atteinte plus rapidement avec un fort inoculum (à partir de 10^7 UFC/mL dans cette étude).

G. Un changement d'état physiologique

Comme illustré par le modèle PKPD semi-mécanistique de Nielsen *et al.* (Figure 35), l'**EI pourrait aussi être dû à un changement de l'état physiologique des bactéries** (E. I. Nielsen et al. 2017). Afin de valider la structure de leur modèle PKPD, c'est-à-dire l'existence d'une sous-population de bactéries « persistantes » (en état Nc), des TKC à 10^6 UFC/mL avec des souches supplémentaires d'*E. coli* (cliniques et de référence) résistantes à la ciprofloxacine ont été réalisées. Une bactéricidie rapide jusqu'à atteindre la limite de quantification (LOQ = 10 UFC/mL), a été observé avec les souches de références. Dans le cas des souches cliniques, une bactéricidie en deux temps a été observée : une première décroissance de 3 $\log_{10}$ UFC/mL, suivie d'une diminution lente (n'atteignant pas la LOQ) a été observée. Ces bactéries « persistantes » ont été ensuite utilisées pour la réalisation d'une seconde TKC. Il en résulte que ces bactéries, initialement persistantes, se comportaient lors de la seconde TKC comme les bactéries qui sont dans un état physiologique S, ce qui indique que les bactéries Nc étaient dans un état réversible. Ces résultats ont permis de valider la structure du modèle PD.

H. Le *quorum sensing*

Le *quorum sensing,* c'est-à-dire la communication entre les bactéries, est un mécanisme qui peut être impliqué dans l'EI. L'implication du *quorum sensing* a été évoquée par Bulitta *et al.* lors de l'étude de l'impact de la taille de l'inoculum de *P. aeruginosa* sur l'activité de la ceftazidime (Bulitta et al. 2009). La ceftazidime est substrat de la pompe d'efflux MexAB-OprM dont l'expression est induite en cas de fortes concentrations dans le milieu extracellulaire d'une molécule du *quorum sensing*, le *N*-butyryl-L-homo-sérine (Maseda et al. 2004; Sawada

et al. 2004). Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la concentration en auto-inducteurs, dans ce cas en *N*-butyryl-L-homo-sérine, dans le milieu extracellulaire est plus importante lors de la phase stationnaire de croissance (Maseda et al. 2004). Ainsi, ce mécanisme a été utilisé pour décrire, à l'aide du modèle semi-mécanistique complexe, la modification de l'activité *in vitro* de la ceftazidime en fonction de la taille de l'inoculum de *P. aeruginosa* (Figure 36).

En résumé, l'EI est un phénomène qui peut être étudié avec différentes méthodes, chacune apportant un degré d'information différent. Cependant quelle que soit la méthode utilisée, il a été montré que l'EI est dépendant de la combinaison antibiotique/souche bactérienne considérée. C'est un phénomène complexe dont les origines peuvent être multiples. Bien que l'impact de la taille de l'inoculum en clinique soit débattu (K. P. Smith et Kirby 2018; Craig, Bhavnani, et Ambrose 2004), l'EI peut remettre en question les critères d'évaluation de l'efficacité des antibiotiques classiquement utilisés tels que la CMI et les index PK/PD (Udekwu et al. 2009; Fantin et al. 2019).

Objectifs

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet INPULSE, cofinancé par l'INSERM et la Région Nouvelle-Aquitaine, dont le but est de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour faire face à l'antibiorésistance et lutter contre les INfections PULmonaires SEvères et/ou hautement transmissibles. Ce travail s'est donc concentré sur le pathogène opportuniste *A. baumannii,* responsable d'infections pulmonaires acquises sous ventilation mécanique. De plus, les polymyxines étant l'un des traitements de dernier recours face aux souches d'*A. baumannii* multirésistantes, la polymyxine B a été choisie comme molécule antibiotique d'étude.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'évaluer l'impact de la taille de l'inoculum bactérien d'*A. baumannii* sur la pharmacodynamie de la polymyxine B. Pour y parvenir, ce travail de thèse a été réalisé selon deux axes complémentaires :

- **Axe I** : Évaluation de l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'activité de la polymyxine B *in vitro*. *Cette partie* ***fait l'objet d'un article scientifique soumis à Antimicrobial Agent and Chemotherapy*****,** dont le manuscrit est présenté.

- **Axe 2** : Comparaison des résultats *in vitro* aux résultats *in vivo* obtenus dans un modèle murin d'infection de la cuisse et d'infection pulmonaire à *A. baumannii*. *Cette partie, en l'état,* ***ne fait pas l'objet d'un article scientifique****. Elle est présentée sous le format IMReD (Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion) en anglais.*

La démarche scientifique de ce travail de thèse est illustrée par la Figure 38.

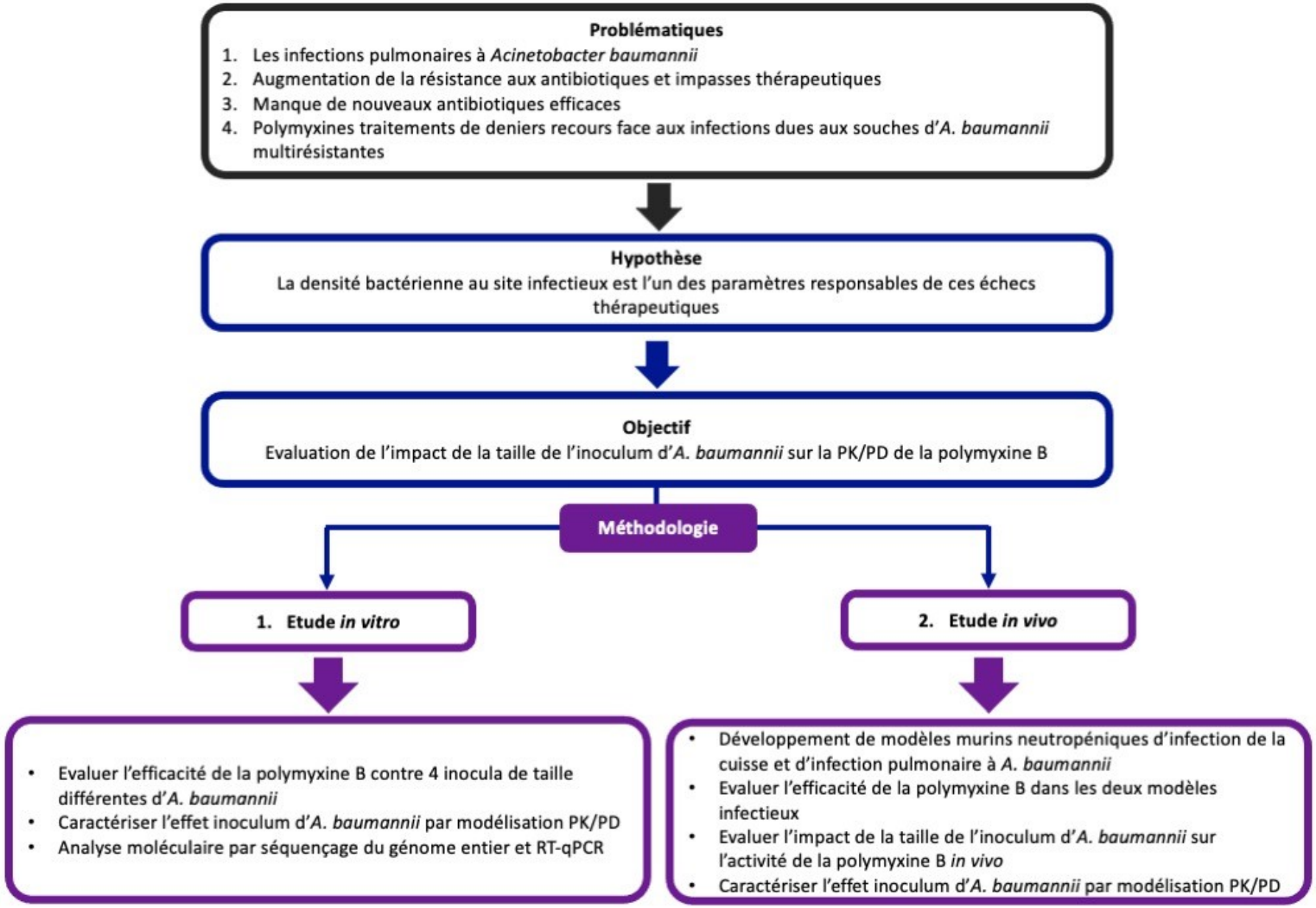


Figure 38. Schéma de la démarche scientifique de la thèse

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Axe 1 : Évaluation de l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'activité de la polymyxine B *in vitro*

Article 1 : A new PKPD model to characterize the inoculum effect of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B *in vitro*

- **Article soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal* (Référence: AAC01789-21)**

Grace Akrong*, Alexia Chauzy*, Vincent Aranzana-Climent, Mathilde Lacroix, Luc Deroche, Laure Prouvensier, Julien. M Buyck, William Couet et Sandrine Marchand (*Co-premiers auteurs)

Résumé

L'effet inoculum (c'est-à-dire la diminution de l'activité des antibiotiques en présence d'un fort inoculum initial) est un phénomène décrit pour divers agents pathogènes. Comme il existe peu de données sur l'effet d'inoculum d'*Acinetobacter baumannii*, nous avons évalué la bactéricidie de la polymyxine B, un antibiotique de dernier recours, contre *A. baumannii* avec plusieurs inocula et nous avons développé un modèle PKPD pour décrire ce phénomène. Des expériences de TKC statiques *in vitro* ont été réalisées avec de la polymyxine B à des concentrations allant de 0,125 à 128 mg/L contre une souche clinique d'*A. baumannii* à quatre inocula allant de 10^5 à 10^8 UFC/mL. Des échantillons ont été prélevés jusqu'à 30 h pour quantifier la charge bactérienne, et les résultats PD ont été modélisés simultanément dans le logiciel NONMEM. L'expression des gènes de résistance à la polymyxine B (*lpxACD, pmrCAB* et *wzc*) et les modifications génétiques de ces gènes ont été étudiées par des expériences de RT-qPCR et de séquençage de l'ADN, respectivement. Le modèle PKPD comprenait une population bactérienne homogène présentant une résistance adaptative. L'effet PD de la polymyxine B a été modélisé par un modèle sigmoïde E_{max} et l'effet inoculum par une augmentation de l'EC_{50} de la polymyxine B avec l'augmentation de l'inoculum initial en utilisant une fonction de puissance. L'activité de la polymyxine B a été diminuée à mesure que la taille de l'inoculum initial augmentait : une augmentation d'un facteur 17 de l'EC_{50} de la polymyxine B a été observée entre l'inoculum le plus faible et le plus élevé. Aucun effet de la polymyxine B et de la taille de l'inoculum n'a été observé sur les gènes étudiés. Le modèle PKPD proposé a permis de décrire et de prédire avec succès l'important effet inoculum *in vitro* d'*A. baumannii* sur l'activité de la polymyxine B. Ces résultats doivent être validés en utilisant d'autres combinaisons bactéries/antibiotiques et des modèles *in vivo*.

A new PKPD model to characterize the inoculum effect of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B *in vitro*

Grace Akrong,[a,b] Alexia Chauzy,[a,b] Vincent Aranzana-Climent, [a,b,c] Mathilde Lacroix,[a,b,d] Luc Deroche,[a,b] Laure Prouvensier,[a,e] Julien. M Buyck,[a,b] William Couet,[a,b,e] and Sandrine Marchand,[a,b,e]#

[a]INSERM U1070, Poitiers, France

[b]Université de Poitiers, Poitiers, France

[c]Uppsala University, Pharmacometrics, Department of Pharmacy, Uppsala, Sweden.

[d]Institut ROCHE, Boulogne-Billancourt, France

[e]CHU de Poitiers, Département de Toxicologie et de Pharmacocinétique, Poitiers, France

Running title: Inoculum effect of *A. baumannii* against polymyxin B

#Address correspondence to Sandrine Marchand, sandrine.marchand@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

The inoculum effect (i.e., reduction in antimicrobial activity at large starting inoculum) is a phenomenon described for various pathogens. Since limited data exist regarding inoculum effect of *Acinetobacter baumannii*, we evaluated killing of *A. baumannii* by polymyxin B, a last-resort antibiotic, at several starting inocula and developed a PKPD model to capture this phenomenon. *In vitro* static time-kill experiments were performed using polymyxin B at concentrations ranging from 0.125 to 128 mg/L against a clinical *A. baumannii* isolate at four starting inocula from 10^5 to 10^8 CFU/mL. Samples were collected up to 30 h to quantify the viable bacterial burden and were simultaneously modeled in the NONMEM software program. The expression of polymyxin B resistance genes (*lpxACD*, *pmrCAB* and *wzc*), and genetic modifications were studied by RT-qPCR and DNA sequencing experiments, respectively. The PKPD model included a single homogeneous bacterial population with adaptive resistance. Polymyxin B effect was modelled as a sigmoidal E_{max} model and the inoculum effect as an increase of polymyxin B EC_{50} with increasing starting inoculum using a power function. Polymyxin B displayed a reduced activity as the starting inoculum increased: a 20-fold increase of polymyxin B EC_{50} was observed between the lowest and the highest inoculum. No effects of polymyxin B and inoculum size were observed on the studied genes. The proposed PKPD model successfully described and predicted the pronounced *in vitro* inoculum effect of *A. baumannii* on polymyxin B activity. These results should be further validated using other bacteria/antibiotic combinations and *in vivo* models.

INTRODUCTION

It is admitted that dense bacterial population may reduce antibiotics efficacy (1, 2). This phenomenon referred as inoculum effect (IE) may have several origins such as greater production of ß-lactamases observed with *E. coli* and leading to reduction of effective concentrations of ß-lactam antibiotics available for bacterial killing (3), greater biofilm barrier formation in the presence of higher *E. coli* bacterial density (4), or larger release of lipopolysaccharides (LPS) reducing *P. aeruginosa* susceptibility to colistin (5). IE has been described for various pathogens such as *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Enterobacter* species (*E. coli*, *K. pneumoniae*) (3, 6, 7). IE may obviously have an effect on treatment efficacy and antibiotic dosing regimen selection, especially in the case of difficult to treat infections with high burden load including endocarditis, meningitis, abscesses, and other deep-seated infections (8). Although, an increase of MIC with inoculum has been observed on several occasions (3, 9), IE is not taken into consideration by regulators since EUCAST and CLSI guidelines rely on MIC determinations at a unique starting inoculum of $5*10^5$ CFU/mL for PK/PD breakpoints determination (10, 11).

IE has often been attested by an 8-fold or more increase of MIC when the starting inoculum increases from $5*10^5$ to $5*10^7$ CFU/mL (8, 12–14), whereas more informative PKPD modeling approaches have only been used on few occasions (4, 15–18). Mechanism-based PKPD models were initially developed and validated by J. Bulitta *et al.* to capture the IE of *P. aeruginosa* on ceftazidime (17) and then colistin (18) effects. Concomitantly a semi-mechanistic model was published by Bhagunde *et al.* describing the IE of *E. coli* on piperacillin activity (4). Although very elegant, these PKPD models relying on mechanistic assumptions are species dependent and may not apply to all sorts of antibiotics/bacteria combinations. Therefore, our objective was to develop a mechanism independent PKPD model with potential large application. *A. baumannii* was selected for this study as a strain responsible for difficult to treat pulmonary infections with potentially high burden load (19), but also because, to our knowledge, *A. baumannii* is a pathogen for which the IE has never been characterized. And polymyxin B (PMB) was chosen as a last resort antibiotic potentially active against *A. baumannii* (20).

MATERIALS AND METHODS

1. Chemicals and bacterial isolates

Polymyxin B (PMB), obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France), was used to prepare fresh stock solutions of 10 mg/mL in sterile water. All chemicals and reagents used were analytical grade.

A clinical strain of *A. baumannii* (CS01), isolated from a patient with a meningitis before treatment with colistin, was used during this study (21).

2. Determination of PMB minimal inhibitory concentrations (MICs)

MICs were determined in triplicate based on the CLSI reference methods (22). Briefly a suspension with an optical density (OD) of 0.1-0.15 (corresponding to $1*10^8$ CFU/mL) of isolated colonies selected from an overnight culture on Mueller Hinton agar (MHA) plate was prepared. This bacterial suspension was used to prepare inocula of 10^5, 10^6, 10^7 or 10^8 CFU/mL in Muller-Hinton broth II cation adjusted (MHB) (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France). Then microdilutions of PMB were prepared in 96-well plates at concentrations ranging from 0.125 to 64 mg/L for each inoculum. The plates were incubated at 35 ± 2°C for 18 ± 2 h, and the MIC for each inoculum was recorded as the lowest drug concentration inhibiting visible bacterial growth. The results were confirmed by a resazurin reduction-based assay (23).

3. Time-kill kinetics curves (TKC) experiments

Bacteria were cultured in 5 mL of MHB with constant shaking (150-170 rpm) overnight at 35 ± 2°C. This overnight suspension was diluted to a 1/50 in MHB with a final volume of 10 mL and was incubated with constant shaking at 35°C during 2 h until an OD of 0.26 was achieved, corresponding to a bacterial density of $1*10^8$ CFU/mL in exponential growth phase. This suspension was centrifuged at 3000 g for 6 min and the pellet was resuspended in 1 mL of MHB to obtain a bacterial density of $1*10^9$ CFU/mL. This suspension was used to prepare several inocula in MHB (20 mL) at concentrations of 10^5, 10^6, 10^7, or 10^8 CFU/mL. PMB was added to the broth at various concentrations ranging from 0.125 to 4 mg/L for the 10^5 CFU/mL

inoculum, from 0.25 to 16 mg/L for the 10^6 CFU/mL inoculum, from 0.5 to 32 mg/L for the 10^7 CFU/mL inoculum and from 1 to 128 mg/L for 10^8 CFU/mL inoculum. Drug-free MHB was used as a positive control for each inoculum. These cultures were incubated at 37°C, with constant shaking and bacterial counts were quantified after 0, 4, 8, 24 and 30 h by plating serial dilutions on MHA plates complemented with 1% active charcoal to prevent PMB carry-over effect (24). At time 0, each starting inoculum was also plated onto MHA plates containing PMB at a concentration of 8 times the corresponding PMB MIC to determine quantitative viable counts of less-susceptible cells CFUs were counted after 24 h of incubation at 37°C (25). The limit of quantification was equal to 800 CFU/mL i.e. 2.9 $\log_{10}$ CFU/mL. Experiments were conducted in triplicate.

4. Pharmacodynamic model

TKC data obtained with the four inocula were simultaneously analyzed using NONMEM 7.4 (ICON plc, Dublin, Ireland) with the Laplacian algorithm and the M3 method for handling observations below the limit of quantification (26). The general structure of the model is detailed in supplemental materials. Briefly, a previously developed semi-mechanistic model describing adaptive resistance was used (27). Different functions (linear, power, basic E_{max} or a sigmoidal E_{max} function) for describing the PMB concentration-effect relationship and adaptive resistance were investigated. PMB was assumed to be stable over the course of the experiment as previously shown and, thus, no PK compartment was included in the model (28). Moreover, empiric functions (linear, exponential or power function) and a mechanism-based model for characterizing the IE were assessed (29). Model selection was based on objective function value (OFV), relative standard errors (RSEs) of the parameter estimates and goodness of fit (GOF) plots (30). Visual predictive checks (VPCs) with stratification on PMB concentration and starting inoculum were drawn to evaluate the predictive performance of the model and taken into account for model selection. Observed bacterial counts were plotted versus time and overlaid with the median and 90% prediction interval obtained by simulating 1000 replicates of the original dataset; the concordance between simulations and observations was inspected visually.

5. Simulations of CFU versus time profiles

Simulations of expected PMB bactericidal effect at 0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mg/L as a function of time with all tested inocula were performed using R software (v.3.5.2) (31) with the mrgsolve R-package (v.0.10.0).

6. Quantification of the expression of PMB resistance genes and DNA sequencing

The expression of PMB resistance genes was quantified by a two-step reverse transcription-real time PCR (RT-qPCR) method during TKC for starting inocula of 10^6 and 10^8 CFU/mL in presence or not of PMB at 1 mg/L with a final volume of 40 mL. The final protocol is detailed in supplemental materials. Moreover, DNA sequences of the most likely resistance genes of *Acinetobacter baumannii* (*pmrA, pmrB, pmrC, lpxA, lpxC, lpxD and eptA*) were analyzed after a whole genome sequencing according to a protocol presented in supplemental materials. Samples were taken over time at 0, 4, 8 and 24 h of the TKC.

RESULTS

1. MIC determinations

MIC values were <0.125, 0.125, 0.25 and 1 mg/L for the 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 inoculum, respectively.

2. Time-kill curves (TKC) experiments

The results of the time-kill experiments are represented as circles in Fig. 1. No PMB effect was observed for concentrations below or equal to 1 mg/L with the inocula of 10^6, 10^7 and 10^8 CFU/mL. For a starting inoculum of 10^5 CFU/mL, a PMB concentration of 4 mg/L resulted in a rapid bacterial decay to undetectable CFU within few hours (< 3h) whereas bacterial killing was less pronounced, and regrowth occurred for the other 3 starting inocula (Fig. 1, circles). Up to 32-fold-higher concentrations were required at a starting inoculum of 10^8 CFU/mL to

achieve a similar bactericidal effect. No pre-existing resistant subpopulations growing on PMB-containing agar plates were observed for all 4 starting inocula tested.

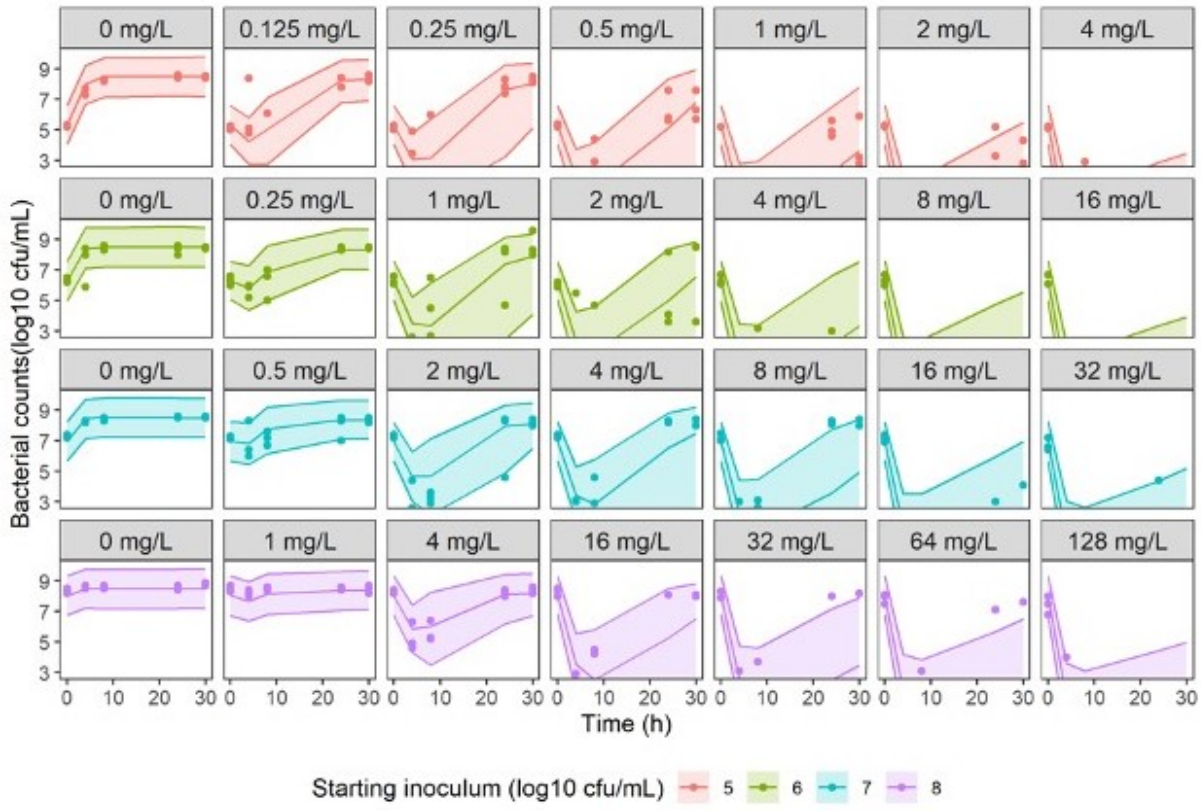


Figure 1. Visual predictive checks (VPC) for the final model. Circles represent experimental data, solid lines the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1000 simulated profiles.

3. Pharmacodynamic model and simulations

TKC data were well described by the model depicted in Fig. 2. Parameter estimates with their corresponding uncertainties are summarized in Table 1. VPCs of the final model are shown in Fig. 1 and GOF plots in Fig. S1.

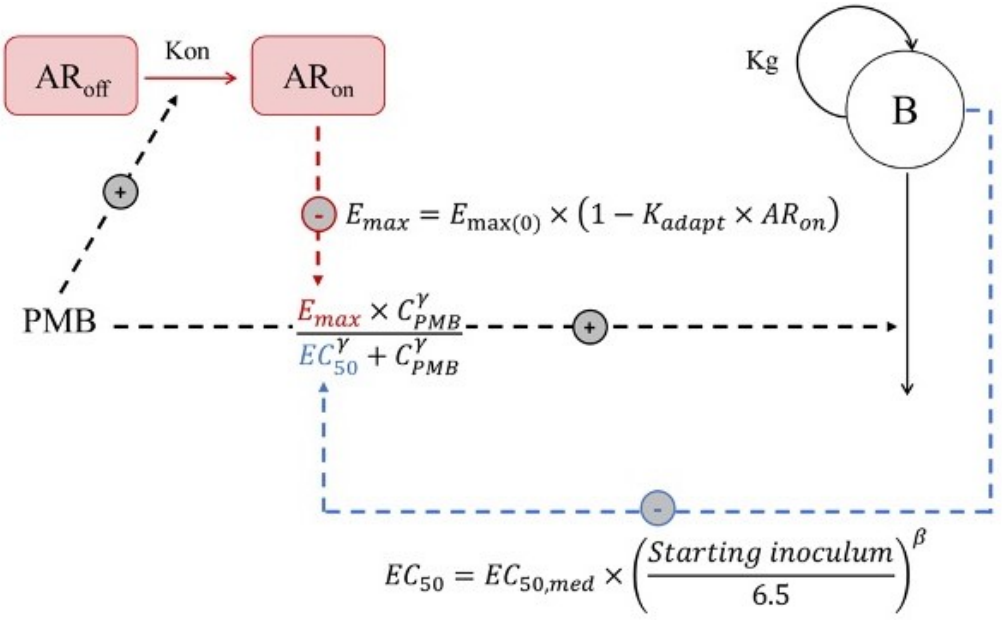


Figure 2. Schematic diagram of the PD final model. Bacteria multiplied with a first-order rate constant (Kg) in the bacterial compartment (B). Polymyxin B (PMB) effect K_{PMB}, was modeled according to an E_{max} model. Adaptive resistance (AR) to PMB occurred when bacteria were exposed to PMB according to a first order rate constant K_{on}.

Bactericidal effect of PMB (K_{PMB}) was best described by a sigmoidal Emax model (Eq. 1).

$$K_{PMB} = \frac{E_{max} \times C_{PMB}^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + C_{PMB}^{\gamma}} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Where E_{max} (h^{-1}) is the maximum kill rate constant; EC_{50} (mg/L), the PMB concentration that results in 50% of E_{max}; C_{PMB}, the PMB concentration and γ, the Hill coefficient that characterizes the steepness of the drug effect relationship. The emergence of adaptive resistance during the experiment was characterized by a transfer rate constant (K_{on}) of non-adapted to adapted bacteria which was not dependent on PMB concentration. Random variability between experiments was included on K_{on} to catch the variability in the bacterial response to PMB from one replicate to another (Table 1). The introduction of inter-experiment variability on Kon was associated with a decrease in the objective function value (529 versus 341) and the residual error (1.64 vs 0.61 log_{10} CFU/mL). The impact of adaptive resistance on PMB antibacterial

effect was best described as a reduction of PMB $E_{max(0)}$ (initial E_{max} value before adaptive resistance has developed) with time following a linear function (K_{adapt}) (Eq. 2).

$$E_{max}=E_{max(0)}\times\left(1-K_{adapt}\times AR_{on}\right) \quad \text{(Eq. 2)}$$

The PD model predicted that the percentage of AR_{on} would increase with time from 0% at time zero to 64%, 87% and 100% at 4, 8 and 24 h of experiment, respectively. Consequently, E_{max} would decrease from its initial value (8.96 h^{-1}) to 4.23, 2.54 and 1.58 h^{-1} after 4 h, 8 h and 24 h of experiment respectively, explaining regrowth observed during TKC experiments.

IE was integrated in the model as an increase of PMB EC_{50} with increasing theoretical starting inoculum using a power function (Eq. 3).

$$EC_{50}=EC_{50,med}\times\left(\frac{\text{Starting inoculum}}{6.5}\right)^{\beta} \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where $EC_{50,med}$ is the EC_{50} for a TKC with a theoretical starting inoculum of $10^{6.5}$ CFU/mL and β the coefficient describing the IE on EC_{50}.

PMB bactericidal effect, adaptive resistance effect and IE were incorporated in the logistic growth model to describe the time course of bacterial counts, such as:

$$\frac{dB}{dt}=Kg\times\left(1-\frac{B}{Bmax}\right)\times B-\frac{\left(E_{max(0)}\times\left(1-K_{adapt}\times AR_{on}\right)\right)\times C_{PMB}^{\gamma}}{EC_{50,med}\times\left(\frac{\text{Starting inoculum}}{6.5}\right)^{\beta}+C_{PMB}^{\gamma}}\times B \quad \text{(Eq. 4)}$$

Where B (CFU/mL) is the susceptible bacterial population, Kg (h^{-1}) is the apparent growth rate constant and Bmax (CFU/mL) the maximum bacterial count reached in the system.

Table 1 : Parameter estimates and relative standard error (RSE) for the final model

Parameter	Unit	Description	Estimate (RSE%)	% CV for IIV (RSE %)
$INOC_8$	log_{10} CFU/mL	Initial bacterial density for 10^8 CFU/mL inoculum	8.06 (1.1)	-
$INOC_7$	log_{10} CFU/mL	Initial bacterial density for 10^7 CFU/mL inoculum	6.96 (1.6)	-
$INOC_6$	log_{10} CFU/mL	Initial bacterial density for 10^6 CFU/mL inoculum	6.29 (1.7)	-
$INOC_5$	log_{10} CFU/mL	Initial bacterial density for 10^5 CFU/mL inoculum	5.33 (2.2)	-
Kg	h^{-1}	Apparent growth rate constant	1.62 (8)	-
B_{max}	log_{10} CFU/mL	Maximum bacterial count reached in the system	8.5 (0.7)	-
$E_{max(0)}$	h^{-1}	Maximum kill rate constant due to PMB when no adaptive resistance has developed	8.96 (9)	-
EC_{50}	mg/L	PMB concentration that results in 50% of $E_{max(0)}$	1.46 (9.1)	-
γ		Hill coefficient that characterizes the steepness of the drug effect relationship	0.656 (5.6)	-
K_{on}	h^{-1}	Rate constant for development of adaptive resistance	0.253 (19.8)	40.8 (17.4)
K_{adapt}		Linear function for impact of adaptive resistance on PMB antibacterial effect	0.824 (2.8)	
ß		Inoculum effect	6.04 (11.5)	-
σ	log_{10} CFU/mL	Additive residual error on log_{10} scale for total bacteria count	0.608 (22)	-

CV : coefficient of variation

IIV: inter-individual variability

An increase of PMB EC_{50} by a factor 20 was predicted between the lowest and the highest inocula (EC_{50} = 0.3, 0.9, 2.28 and 5.12 mg/L for inoculum of 10^5, 10^6, $10^7$and 10^8 CFU/mL, respectively). Much higher PMB concentrations would be necessary to observe PMB

bactericidal effect against dense bacterial populations as illustrated in simulations of expected bacterial counts versus time for different inocula (Fig. 3).

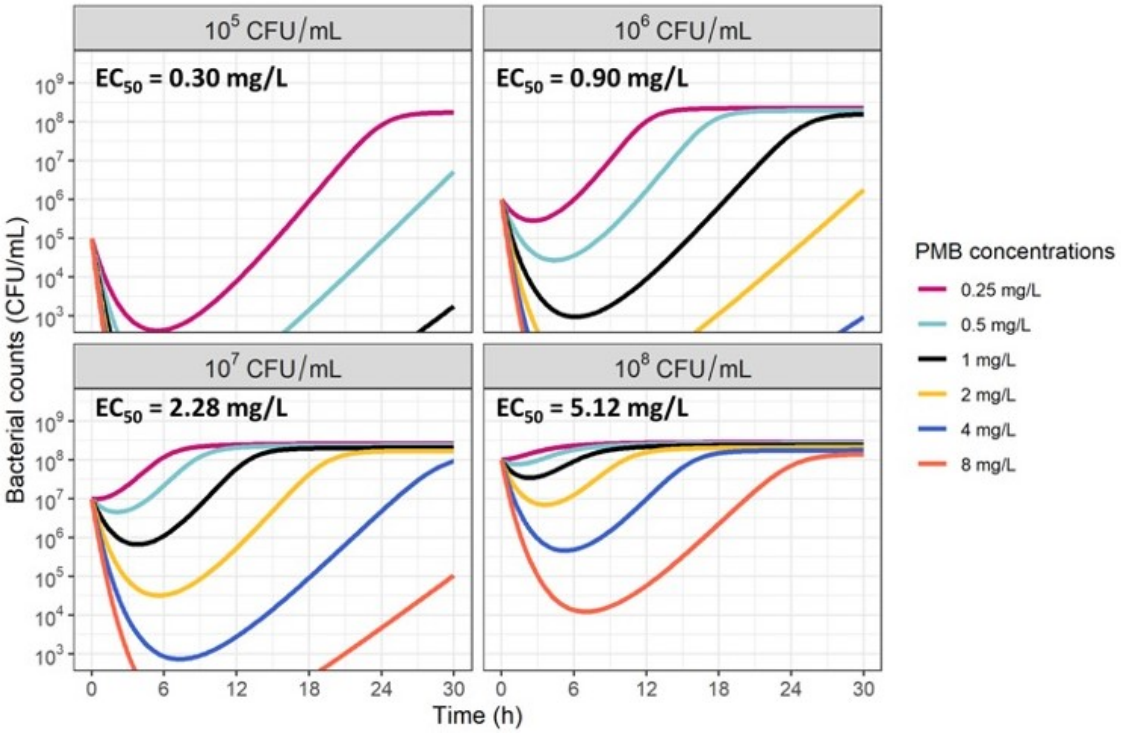


Figure 3. Simulations of expected bacterial counts (CFU/mL) versus time in presence of various concentrations of PMB (pink: 0.25 mg/L; light blue: 0.5 mg/L; black: 1 mg/L; yellow: 2 mg/L; dark blue: 4 mg/L; and orange: 8 mg/L) for various starting inocula. EC_{50} corresponding to PMB concentration that results in 50% of $E_{max(0)}$.

At a concentration corresponding to the MIC of PMB with the study strain (0.25 mg/L), the model predicts a decrease followed by a regrowth is observed with the lowest inoculum (10^5 CFU/mL), while at the highest inoculum (10^8 CFU/mL) no effect is predicted. Similarly, at the highest simulated concentration (8 mg/L), a total bactericidal effect is predicted at the lowest inoculum (10^5 CFU/mL), whereas with the highest inoculum (10^8 CFU/mL) a decay followed by a regrowth was predicted by our model. To better illustrate the IE, initial killing half-lives (IK-HL) of various concentrations of PMB (0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 mg/L) with the 4 inocula were calculated from Eq. 1 and are presented in Table 2.

Table 2 : Model derived initial killing half-lives (min) at various PMB concentrations and initial inocula

PMB concentrations (mg/L) / Inocula (CFU/mL)	0.25	0.5	1	2	4	8
10^5	10	8	7	6	5	5
10^6	15	11	9	7	6	6
10^7	24	17	13	10	8	7
10^8	38	26	18	13	10	8

4. Expression of PMB resistance genes and genetic modifications in PMB resistance genes

Expression of LPS-modifying (*pmrCAB*, *lpxACD)* and capsule genes *(wzc)* did not differ significantly in *A. baumannii* over time (4 h, 8 h and 24 h), with or without treatment and between the two inocula tested (10^6 and 10^8 CFU/mL) (Fig. S2). No genetic modification was observed in *pmrCAB*, *lpxACD, wzc* and *eptA* genes, with or without treatment and between the two inocula tested (10^6 and 10^8 CFU/mL) (data not shown).

DISCUSSION

This study has demonstrated a strong *in vitro* IE of *A. baumannii* on PMB antimicrobial activity, consistent with those of *P. aeruginosa* on PMB (32) and also colistin (18) previously described. Yet the most innovative aspect of this new study was the development of an original PKPD model. On many occasions, TKC exhibit an initial rapid decay of CFU with time followed by regrowth after few hours (Fig. 1) (16–18). This type of behavior can be described by two types

of PKPD models, with either two heterogeneous subpopulations, S for sensitive and R for resistant (S/R model), or a single population with adaptive resistance (AR model). Because of its relative simplicity, formal statistical comparisons frequently favor the S/R model, due to the parsimony principle (33), although this model may not be consistent with the mechanism responsible for regrowth and may be misleading. However, in this study, the tested AR model (Fig. 2) was statistically superior to the S/R model to describe the experimental TKC data. In agreement with that, bacterial susceptibility testing at time 0 failed to demonstrate the presence of a small fraction of R bacteria to support the S/R model. The simultaneous occurrence of IE and adaptive resistance (AR) makes MIC modifications with bacterial density difficult to interpret, whereas PKPD modeling can discriminate between these separate phenomena to describe the CFU versus time curves (Fig. 2). Accordingly, an increase of PMB EC_{50} modelled by a power function was added to the initial AR model to take into account the IE (Eq. 3). This model presents similarities with that previously proposed by Bhagunde *et al.,* to capture the IE of *E. coli* on piperacillin killing effect, and relying on a reduction of the effective drug concentration available for bacterial killing as the result of a greater biofilm barrier in the presence of higher bacterial density (4). However, biofilm formation is unlikely to occur during in vitro TK experiments under constant shaking, and for that reason our objective was to develop a non-mechanistic model. Yet the model developed by Bhagunde *et al.* and ours both relate the decrease in killing effect with time to the baseline inoculum, and therefore do not capture the changing antibiotic activity together with changing bacterial density with time during TKC experiments, as previously mentioned by Nielsen and Friberg (34). However, substitution of the starting inoculum term in Eq. 3, by the changing value of log CFU with time, leads to model unidentifiability, probably due to the appearance log CFU on both sides of the equal sign in Eq. 4 and interaction thus introduced between the IE, PMB effect and adaptive resistance parameters.

Noticeably, Nielsen *et al.* have proposed to extend the application of their PD model in which growing bacteria are eventually converted into resting state, initially proposed to describe the biphasic killing behavior sometimes observed during TKC experiments or/and the decrease of growth rate before reaching plateau (29, 35), to investigate IE. This alternative was then

successfully tested using *E. coli* and ciprofloxacin and considering two subpopulations of bacteria (S and R), each present in a growing phase possibly converted more or less rapidly into resting state, as a function of the inoculum size (16). However, this model was tested, but without success, to describe our data.

Altogether, our model provided a reasonably good description of the experimental data and offers the advantage of relative simplicity with no mechanistic assumptions. It would now be interesting to assess this model capability to describe the IE of bacteria producing ß-lactamases in the presence of ß-lactam antibiotics.

The EC_{50} values estimated during the present study increased from 0.30 to 5.12 mg/L when the starting inoculum increased from 10^5 to 10^8 CFU /mL (Fig. 3). This 17-fold variation suggests a major IE but remains difficult to interpret. Simulations were conducted to better illustrate the consequences of the IE on CFU versus time curves during TKC experiments with PMB concentrations varying between 0.25 and 8 mg/L (Fig. 3), using a range of total concentrations consistent with those encountered in patients (36). The model developed in this study predicted an important reduction of the PMB PD effect in the presence of a dense bacterial population, however adaptive resistance is a confounding phenomenon that also contributes to these CFU versus time profiles, which therefore do not reflect exclusively the PMB killing rate decreases when bacterial density increases. However, the initial killing rate, when bacteria are not yet adapted, can be used to characterize the IE specifically. It was derived from Eq. 1, using for each starting inoculum the corresponding EC_{50} value, and converted into the more explicit initial killing half-lives (IK-HL) (Table 2). As expected, the highest PMB concentrations lead to the shortest IK-HL. But more interestingly this modeling suggests that the IE is attenuated at high PMB concentrations. As an example, at a PMB concentration equal to 8 mg/L, IK-HL increased by 60% (from 5 to 8 min) when the starting inoculum increased from 10^5 to 10^8, whereas at a PMB concentration of 0.25 mg/L, IK-HL increased by 380% (from 10 to 38 min) when the starting inoculum increased from 10^5 to 10^8 (Table 2). Noticeably, with adaptive resistance developing with time, the specific IE would be

essentially observed at early times when the fraction of adapted bacteria is negligible or at least still limited, but in clinical practice, at these early times PMB concentrations are the highest, limiting the impact of IE. However, it should be reminded that this model was developed after *in vitro* experiments, presenting a number of advantages, such as the possibility of comparing a number of various inocula in a large range (10^5 to 10^8) as well as a large range of PMB concentrations (0.125 to 128 mg/L). These conditions are necessary for developing such a model combining IE and adaptive resistance but are not affordable for *in vivo* experiments. Yet the capability of this model to adequately describe IE *in vivo*, remains to be assessed before extrapolating results of this present experiment to the clinical setting.

As opposed to Bulitta *et al.* who developed a mechanistic model to describe the IE of *P. aeruginosa* on polymyxin E (or colistin) (18), the present model was developed without underlying mechanistic hypothesis. Yet it would have been of interest to explain this IE, but this was made difficult due to the remarkable genetic flexibility of *A. baumannii* (37). We simply tried to verify that AR and IE observed with this particular strain of *A. baumannii* in the presence of PMB, were two distinct and unrelated phenomena, as implicitly considered in the model. The expression of seven genes (*lpxACD, pmrCAb and wzc*) known to participate into *A. baumannii* adaptive resistance in the presence of PMB (38–42) was investigated, but no significant change was observed, regardless of the inoculum size (Fig. S2). Although regulation of other genes than those tested cannot be excluded, these experiments are consistent with the fact that AR developing with time depends upon PMB concentration but not of bacterial density. Lastly, although genetic changes are unlikely to occur repeatedly during 30 h TKC experiments, sequencing of the above-mentioned genes was performed, but no deletions or mutations were observed.

In conclusion a PKPD model devoid of mechanistic rationale for IE, and distinguishing between IE and AR, has been successfully developed to characterize the *in vitro* IE of *A. baumannii* in the presence of PMB. This modeling approach is far more informative than comparing MICs values at different inocula. Yet the capability of this new model to describe IE observed with

other bacteria/antibiotics and resulting from various mechanism, remains to be evaluated. *In vivo* evaluation of this IE observed *in vitro* also needs to be done.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of G. Akrong was provided by the Nouvelle Aquitaine Region and Inserm.

REFERENCES

1. Lenhard JR, Bulman ZP. 2019. Inoculum effect of β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 74:2825–2843.
2. Brook I. 1989. Inoculum effect. Rev Infect Dis 11:361–368.
3. López-Cerero L, Picón E, Morillo C, Hernández JR, Docobo F, Pachón J, Rodríguez-Bañ J, Pascual A. 2010. Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxycillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum β-lactamase-producing and extended-spectrum β-lactamase-non-producing Escherichia coli isolates. Clinical Microbiology and Infection 16:132–136.
4. Bhagunde P, Chang K-T, Singh R, Singh V, Garey KW, Nikolaou M, Tam VH. 2010. Mathematical Modeling To Characterize the Inoculum Effect. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:4739–4743.
5. Yokota S, Hakamada H, Yamamoto S, Sato T, Shiraishi T, Shinagawa M, Takahashi S. 2018. Release of large amounts of lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa cells reduces their susceptibility to colistin. International Journal of Antimicrobial Agents 51:888–896.
6. Kesteman A-S, Ferran AA, Perrin-Guyomard A, Laurentie M, Sanders P, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. 2009. Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma

exposure on the amplification of resistant subpopulations of Klebsiella pneumoniae in a rat lung infection model. Antimicrob Agents Chemother 53:4740–4748.

7. Mizunaga S, Kamiyama T, Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J. 2005. Influence of inoculum size of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56:91–96.
8. Thomson KS, Moland ES. 2001. Cefepime, Piperacillin-Tazobactam, and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 45:3548–3554.
9. Salas JR, Jaberi-Douraki M, Wen X, Volkova VV. 2020. Mathematical modeling of the 'inoculum effect': six applicable models and the MIC advancement point concept. FEMS Microbiology Letters 367.
10. EUCAST: MIC determination.
11. M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute.
12. Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Nakamura S, Uno N, Hasegawa H, Izumikawa K, Kohno S, Yanagihara K. 2014. In vitro and in vivo activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae. Clinical Microbiology and Infection 20:O831–O839.
13. Kim T, Lee SC, Bae M, Sung H, Kim M-N, Jung J, Kim MJ, Kim S-H, Lee S-O, Choi S-H, Kim YS, Chong YP. 2020. In Vitro Activities and Inoculum Effects of Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam against Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates from South Korea. 12. Antibiotics 9:912.
14. Adler A, Ben-Dalak M, Chmelnitsky I, Carmeli Y. 2015. Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in Klebsiella pneumoniae Isolates with Borderline Carbapenem Resistance. Antimicrob Agents Chemother 59:5014–5017.
15. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. J Antimicrob Chemother 63:745–757.
16. Nielsen EI, Khan DD, Cao S, Lustig U, Hughes D, Andersson DI, Friberg LE. 2017. Can a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) model be predictive across bacterial

densities and strains? External evaluation of a PKPD model describing longitudinal in vitro data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72:3108–3116.

17. Bulitta JB, Ly NS, Yang JC, Forrest A, Jusko WJ, Tsuji BT. 2009. Development and Qualification of a Pharmacodynamic Model for the Pronounced Inoculum Effect of Ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 53:46–56.
18. Bulitta JB, Yang JC, Yohonn L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, Jusko WJ, Forrest A, Tsuji BT. 2010. Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of Pseudomonas aeruginosa Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model. Antimicrob Agents Chemother 54:2051–2062.
19. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. 2014. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Crit Care 18:208.
20. Garnacho-Montero J, Timsit J-F. 2019. Managing Acinetobacter baumannii infections. Current Opinion in Infectious Diseases 32:69–76.
21. López-Rojas R, Jiménez-Mejías ME, Lepe JA, Pachón J. 2011. Acinetobacter baumannii Resistant to Colistin Alters Its Antibiotic Resistance Profile: A Case Report From Spain. The Journal of Infectious Diseases 204:1147–1148.
22. MR01Ed2E | Polymyxin Breakpoints for Enterobacterales, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter spp., 2nd Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute.
23. Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. 2019. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 57.
24. Broussou DC, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, Ferran AA. 2019. Comparison of in vitro static and dynamic assays to evaluate the efficacy of an antimicrobial drug combination against Staphylococcus aureus. PLoS One 14:e0211214.
25. El Halfawy OM, Valvano MA. 2015. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clin Microbiol Rev 28:191–207.
26. Beal SL. 2001. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:481–504.

27. Mohamed AF, Cars O, Friberg LE. 2014. A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on Pseudomonas aeruginosa in vitro with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 69:1350–1361.
28. Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. 2002. Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29:203–212.
29. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2011. Predicting In Vitro Antibacterial Efficacy across Experimental Designs with a Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55:1571–1579.
30. Nguyen THT, Mouksassi M-S, Holford N, Al-Huniti N, Freedman I, Hooker AC, John J, Karlsson MO, Mould DR, Ruixo JJP, Plan EL, Savic R, Hasselt JGC van, Weber B, Zhou C, Comets E, Mentré F. 2017. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology 6:87–109.
31. R Core Team. 2021. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at https://www.R-project.org/.
32. Tam VH, Schilling AN, Vo G, Kabbara S, Kwa AL, Wiederhold NP, Lewis RE. 2005. Pharmacodynamics of Polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 49:3624–3630.
33. Jacobs M, Grégoire N, Couet W, Bulitta JB. 2016. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. PLoS Comput Biol 12:e1004782.
34. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacol Rev 65:1053–1090.
35. Nielsen EI, Viberg A, Löwdin E, Cars O, Karlsson MO, Sandström M. 2007. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. 1. Antimicrob Agents Chemother 51:128–136.

36. Zavascki AP, Goldani LZ, Cao G, Superti SV, Lutz L, Barth AL, Ramos F, Boniatti MM, Nation RL, Li J. 2008. Pharmacokinetics of Intravenous Polymyxin B in Critically Ill Patients. Clinical Infectious Diseases 47:1298–1304.
37. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. 2017. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev 30:409–447.
38. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of Acinetobacter baumannii Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55:3370–3379.
39. Trebosc V, Gartenmann S, Tötzl M, Lucchini V, Schellhorn B, Pieren M, Lociuro S, Gitzinger M, Tigges M, Bumann D, Kemmer C. 2019. Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. mBio 10.
40. Lesho E, Yoon E-J, McGann P, Snesrud E, Kwak Y, Milillo M, Onmus-Leone F, Preston L, St. Clair K, Nikolich M, Viscount H, Wortmann G, Zapor M, Grillot-Courvalin C, Courvalin P, Clifford R, Waterman PE. 2013. Emergence of Colistin-Resistance in Extremely Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Containing a Novel pmrCAB Operon During Colistin Therapy of Wound Infections. The Journal of Infectious Diseases 208:1142–1151.
41. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, Michael FS, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:4971–4977.
42. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. 2004. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. Infection and Immunity 72:7107–7114.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

MATERIALS AND METHODS

1. Pharmacodynamic model

A logistic growth model with one compartment for drug-susceptible growing bacteria was used to describe the *in vitro* bacterial population dynamics (1, 2):

$$\frac{dB}{dt} = Kg \times \left(1 - \frac{B}{Bmax}\right) \times B \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Where, B (CFU/mL) is the susceptible bacterial population, Kg (h^{-1}) is the apparent growth rate constant and B_{max} (CFU/mL) the maximum bacterial count reached in the system.

The logistic growth model was modified to incorporate PMB bactericidal activity, such as:

$$\frac{dB}{dt} = Kg \times \left(1 - \frac{B}{Bmax}\right) \times B - K_{PMB(0)} \times B \qquad \text{(Eq. 2)}$$

Where $K_{PMB(0)}$ (h^{-1}) is the maximal rate constant of bacterial killing at time 0, when no resistance has developed. Multiple functions (linear, power, basic E_{max} or a sigmoidal E_{max} function) for $K_{PMB(0)}$ were tested. PMB was assumed to be stable over the course of the experiment as previously shown and, thus, no PK compartment was included in the model (3).

A function representing adaptation of the bacteria to PMB was tested to model the emergence of resistance, as previously described (4). Briefly, compartments AR_{on} and AR_{off} representing the fraction of adapted and non-adapted bacteria respectively were added in the model with K_{on} and K_{off} describing the rate of development and reversal of adaptive resistance, respectively.

$$\frac{dARon}{dt} = Kon \times ARoff - Koff \times ARon \qquad \text{(Eq. 3)}$$

$$\frac{dARoff}{dt} = Koff \times ARon - Kon \times ARoff \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Where multiple functions (linear, power, basic E_{max} or a sigmoidal E_{max} function) for K_{on} (h^{-1}) were tested. At the beginning of the experiment all bacteria were assumed to be non-adapted (AR_{on} = 0 and AR_{off} = 1) but in the presence of PMB adaptation developed over time, affecting $K_{PMB(0)}$. Different functions were tested to characterize the reduction of $K_{PMB(0)}$ from its initial value with the increased proportion of resistance development (Aron), and incorporated into Eq. 2 as described in Eq. 5.

$$\frac{dB}{dt} = Kg \times \left(1 - \frac{B}{Bmax}\right) \times B - K_{PMB(0)} \times \left(1 - K_{adapt} \times ARon\right) \times B \qquad \text{(Eq. 5)}$$

Where K_{adapt} is the function characterizing drug inhibition due to adaptive resistance.

The impact of the inoculum size on PMB bactericidal activity was modeled either as a decrease of $K_{PMB(0)}$ or an increase of K_{on} with increasing starting inoculum using an empirical function. As an alternative to the empirical models a mechanism-based model including two subpopulations, one growing drug-susceptible population and one non-growing drug-insensitive population, was evaluated to characterize the inoculum effect as previously described (5). The residual errors, the difference between the observed and model-predicted values at each time point, were additive on a log scale for bacteria counts (log_{10} CFU/mL).

2. Quantification of the expression of PMB resistance genes

a. RNA extraction and cDNA synthesis

Different volumes of bacterial suspensions were collected to have a sufficient amount of RNA to extract, depending of inocula and sampling times: 1 mL of the 10^9 CFU/mL bacterial suspension at time 10 mL of each condition (with or without treatment and for both inocula) at 4 h and 8 h and 1 mL of each condition at 24 h. Samples were centrifuged (3000 g, 10 min) and the pellets were resuspended in 0.6 mL of DNA/RNA shield (Zymo research,Irvine, CA, USA) and were conserved at -20°C to stabilize the bacterial cells until RNA extraction. Bacteria were lysed with a ZR BashingBead™ Lysis tube (Zymo research) for 15 minutes under horizontal shaking. Total RNAs were extracted from each sample with the *Quick*-RNA Fungal/Bacterial kit (Zymo research) according to the manufacturer's instructions. Sample were treated with DNAse I (Zymo research) on column to eliminate residual genomic DNA

(gDNA) according to manufacturers' instructions. The concentration of total RNA was estimated using the Nanodrop One system (Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Extracted total RNA (1 µg) were used to synthetized cDNA with the FIREScript® RT cDNA synthesis kit (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), according to the manufacturer's inctructions, using the iCycler PCR systems (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

b. Real-time PCR (qPCR) method

The expression genes assumedly involved in PMB resistance of *A. baumannii* were analyzed quantitatively by real-time PCR method including genes of the LOS biosynthesis pathway (*lpxA*, *lpxC* and *lpxD*) (6, 7), genes of the PmrA-PmrB sensor system (*pmrA*, *pmrB* and *pmrC*) (8, 9) and gene from the export system to the outer membrane of the capsular exopolysaccharides (*wzc*) (10). The primers were designed from *A. baumannii* ATCC19606 genome for the genes and for the reference gene (*groEL*) with Geneious Prime software (Auckland, New-Zealand) and their sequences are provided in Table S1. qPCR was performed from cDNA with the iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System. All samples were analyzed in duplicate, and the relative expression of genes was normalized by the expression of the reference gene *groEL.* The relative differences in mRNA expression levels were determined using comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) between the initial expressions at 0 h and the different samples collected over time. The results were analyzed with the CFX Maestro Software (Bio-rad) and are expressed in $Log_2 (2^{-\Delta\Delta Ct})$.

3. DNA sequences analysis of PMB resistance genes

DNA sequences of the most likely resistance genes of *Acinetobacter baumannii* (*pmrA, pmrB, pmrC, lpxA, lpxC, lpxD and eptA*) were analyzed after a whole genome sequencing according to the protocol below.

a. DNA extraction

One to ten milliliters of liquid culture from time-kill experiments were sampled and centrifuged at 3000 g for 10 min. Supernatant was removed, and pellet was resuspended in 0.6 mL of DNA/RNA-Shield (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and stored at -20°C. Genomic DNA (gDNA) was extracted from frozen samples using QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Total extracted gDNA was quantified using a Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific).

b. Library preparation and sequencing

One microgram of previously extracted DNA was repaired and end-prepped using NEBNext Companion Module for Oxford Nanopore Technologies (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) following manufacturer's instructions. Native barcoding was processed using the Native Barcoding Expansion kit EXP-NBD104 (ONT, Oxford, UK). Each sample was pooled, and ligation of adapters was performed with the Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 (ONT, Oxford, UK). Purification was carried out at each step using NucleoMag NGS Clean-up and Size Select magnetic beads (Macherey-Nagel, Düren,Germany). Prepared library was loaded on a FLO-MIN106 R9.4.1 flow cell (ONT, Oxford, UK) and sequencing using a MinION for 72 h.

c. Analysis of sequencing data

Raw data in FAST5 format were base-called, de-multiplexed, barcodes trimmed, and adaptors trimmed in real-time on a MinIT (ONT, Oxford, UK). MinIT output was FASTQ files. Assembly was performed using Flye v2.8.3-b1695 (11) and contigs were polished using Medaka 1.4.3 (ONT, Oxford, UK). Gene sequence comparison was achieved on Geneious Prime v2021.2.2 (Biomatters, Auckland, New Zealand).

Table S1. List of primers used in detecting *A. baumannii* PMB resistance genes

Gene	Sequence (5'→ 3')	Function
groEL (F)	ATCGGTGCAGCAACTGAAGT	Reference gene
groEL (R)	TCTTCAACTGCTGCACGAGT	
lpxA (F)	TGGTGATCACGTTATTGTGGGT	Biosynthesis of LOS
lpxA (R)	TGTGCAGGGTTACCAGAAGC	
lpxC (F)	TGCGATTGCCGGTTTAGGAA	
lpxC (R)	AGGAGCATCTTGTTCACGCA	
lpxD (F)	TGTATTCTAGCTGGGGCGTG	
lpxD (R)	CCCGAAGAGTAAGTTCCAGCT	
pmrA (F)	AGATCCGTCAAAGAGCAGCAA	PmrA-PmrB sensor system
pmrA (R)	TGCATGAATACGGGCAAGCA	
pmrB (F)	CGACTGATTTGGGGCACCT	
pmrB (R)	CTCAGCTGTCCTTTCCGCTA	
pmrC (F)	TCGCGTTGAGCAATACCAGA	
pmrC (R)	GCAGGTCCATGACTACCCAC	
wzc (F)	AGTAAAGGGGCTTCTGCTGC	Export system to the outer membrane of the capsule
wzc (R)	TTCTGCTTGGGCTGGTGATT	
F : forward ; R : reverse		

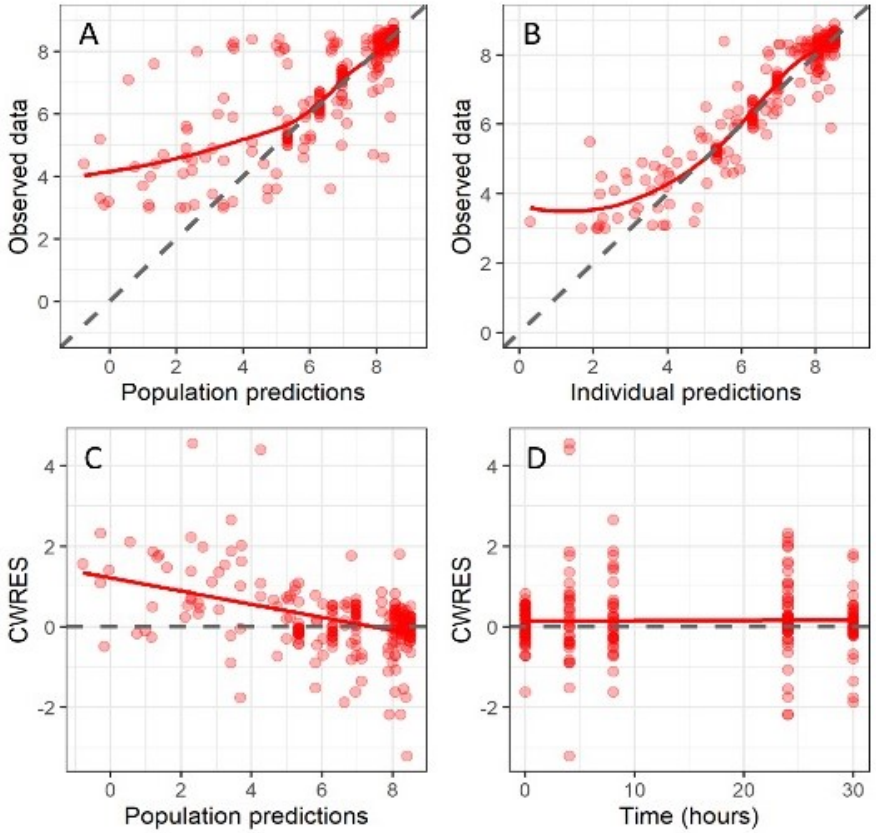


Figure S1. Goodness of fit plots (GOF) of the final model. A: observed data versus population predicted bacterial counts. B: observed data versus individual predicted bacterial counts. C: conditional weighted residuals (CWRES) versus population predictions. D: Conditional weighted residuals versus time.

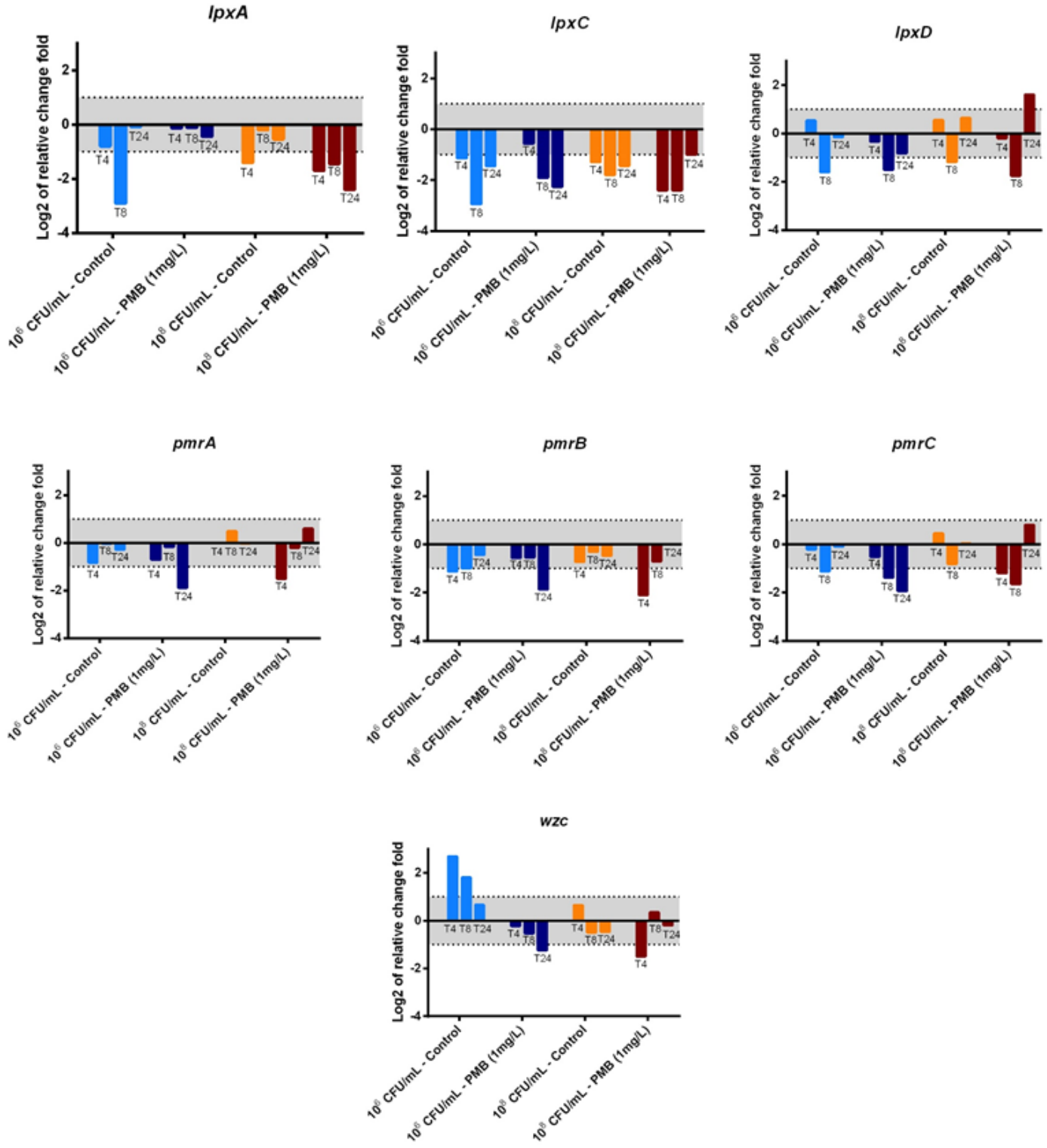


Figure S2. Relative expression overtime of all the studied genes in *A. baumannii* CS01 with a starting inoculum of 10^6 and 10^8 CFU/mL with or without PMB 1mg/L. *The shaded areas correspond to non-significant relative fold changes*

Article 1 : "A new PKPD model to characterize the inoculum effect of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B *in vitro*"

REFERENCES

1. Campion JJ, McNamara PJ, Evans ME. 2005. Pharmacodynamic modeling of ciprofloxacin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 49:209–219.
2. Tam VH, Schilling AN, Nikolaou M. 2005. Modelling time–kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 55:699–706.
3. Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. 2002. Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29:203–212.
4. Mohamed AF, Cars O, Friberg LE. 2014. A pharmacokinetic/pharmacodynamic model developed for the effect of colistin on Pseudomonas aeruginosa in vitro with evaluation of population pharmacokinetic variability on simulated bacterial killing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 69:1350–1361.
5. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2011. Predicting In Vitro Antibacterial Efficacy across Experimental Designs with a Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55:1571–1579.
6. Singh JK, Adams FG, Brown MH. 2019. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in Acinetobacter baumannii. Front Microbiol 9.
7. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, Michael FS, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:4971–4977.
8. Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2011. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of Acinetobacter baumannii Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55:3370–3379.

9. Trebosc V, Gartenmann S, Tötzl M, Lucchini V, Schellhorn B, Pieren M, Lociuro S, Gitzinger M, Tigges M, Bumann D, Kemmer C. 2019. Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. mBio 10.
10. Geisinger E, Isberg RR. 2015. Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in Acinetobacter baumannii. PLoS Pathog 11.
11. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. Nat Biotechnol 37:540–546.

Axe 2 : Comparaison des résultats *in vitro* aux résultats *in vivo* obtenus dans un modèle murin d'infection de la cuisse et d'infection pulmonaire à *A. baumannii*

Article 2 : *In vivo* PK/PD analysis of the impact of the inoculum size of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B

- **Partie présentée sous le format IMReD (Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion) en anglais**

Grace Akrong*, Alexia Chauzy*, Vincent Aranzana-Climent, Isabelle Lamarche, Hélène Mirfendereski, Julien. M Buyck, William Couet et Sandrine Marchand (*Co-premiers auteurs)

Résumé

La réduction de l'activité antimicrobienne à de fortes densités bactériennes est un phénomène microbiologique connu sous le nom d'effet inoculum (EI). Dans une précédente étude *in vitro*, nous avons observé un effet inoculum significatif pour la polymyxine B (PMB) contre une souche clinique d'*Acinetobacter baumannii*, un pathogène représentant une menace mondiale pour la santé humaine. Peu d'études *in vivo* ont étduié l'impact de la taille de l'inoculum sur la survie ou l'efficacité des antibiotiques. Notre objectif était donc d'évaluer l'influence de la taille de l'inoculum d'une souche clinique d'*A. baumannii* sur la PMB *in vivo* au cours du temps. Des modèles murins neutropéniques d'infection pulmoanire et d'infection de la cuisse à *A. baumannii* ont été développés pour étudier l'efficacité de la PMB administrée par voie sous-cutanée en dose unique (1, 5, 15 et 40 mg/kg). Par ailleurs, l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* (10^6 et 10^7 UFC/cuisse) en présence de PMB a été étudié chez les souris présentant une infection de la cuisse. La pharmacocinétique *in vivo* de la PMB a été bien décrite par un modèle PKPD bicompartimental comprenant une absorption saturable à partir du site d'injection sous-cutanée, et une élimination linéaire. Le PMB s'est révélée plus efficace dans le modèle d'infection de la cuisse que dans le modèle d'infection pulmonaire, où aucune diminution significative des bactéries n'a été observée quelles que soient les doses de PMB administrées. Par conséquent, le modèle PD n'a été élaboré qu'à partir des données de l'infection de la cuisse aux deux inocula. Une diminution de l'efficacité de la PMB a été observée pour l'inoculum de 10^7 UFC/cuisse par rapport à l'inoculum de 10^6 UFC/cuisse, surtout à 24h avec la plus forte dose de PMB (40 mg/kg). L'EI a été modélisé par une diminution de 15 % de l'effet bactéricide *in vivo* de la PMB lorsque l'inoculum de départ passe de 10^6 à 10^7 UFC/cuisses. Cependant, cet EI *in vivo* n'était pas aussi important que celui précédemment caractérisé *in vitro*. D'autres expériences avec un inoculum de départ plus faible sont en cours pour confirmer ce résultat *in vivo*.

***In vivo* PKPD analysis of the impact of the inoculum of *Acinetobacter baumannii* on polymyxin B**

Grace Akrong,[a,b] Alexia Chauzy,[a,b] Vincent Aranzana-Climent,[a,b,c] Isabelle Lamarche,[a,b] Hélène Mirfendereski,[a,d] Julien. M Buyck,[a,b] William Couet,[a,b,d] and Sandrine Marchand,[a,b,d]#

[a]INSERM U1070, Poitiers, France

[b]Université de Poitiers, Poitiers, France

[c]Uppsala University, Pharmacometrics, Department of Pharmacy, Uppsala, Sweden.

[d]CHU de Poitiers, Département de Toxicologie et de Pharmacocinétique, Poitiers, France

Running title: Effect of inoculum size on PKPD of polymyxin B *in vivo*

#Address correspondence to Sandrine Marchand, sandrine.marchand@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

The reduction in antimicrobial activity at high bacterial densities is a microbiological phenomenon known as the inoculum effect. In a previous *in vitro* study, we observed a significant inoculum effect (IE) for polymyxin B (PMB) against a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*, a pathogen representing a global threat to human health. Few *in vivo* studies have investigated the impact of inoculum size on survival or antibiotic efficacy. Therefore, our objective was to evaluate the influence of inoculum size of this *A. baumanni*i clinical isolate on PMB *in vivo* over time. Neutropenic murine models of lung and thigh infections were developed to study the efficacy of PMB after a single subcutaneous administration (1, 5, 15 and 40 mg/kg). In addition, the impact of *A. baumannii* inoculum size (10^6 and 10^7 CFU/thigh) in the presence of PMB was studied in mice with thigh infection. *In vivo* PMB PK was well described by a two-compartment model including saturable absorption from the subcutaneous injection site and linear elimination. PMB was more effective in the thigh infection model than in the lung infection model where no significant bacterial decrease was observed whatever PMB doses administered. Consequently, the PD model was only developed using data from thigh infection at the two inocula. A decrease of PMB efficacy was observed for the 10^7 CFU/thigh compared to the 10^6 CFU/thigh inoculum, especially at 24h with the highest dose of PMB (40mg/kg). The IE was modeled as a decrease of 15% in the *in vivo* PMB bactericidal effect when the starting inoculum increases from 10^6 to 10^7 CFU/thigh. However, this *in vivo* IE was not as important as previously characterized *in vitro*. Further studies with a lower starting inoculum are underway to confirm this *in vivo* result.

INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is an opportunistic Gram-negative pathogen responsible for severe clinical infections that could be encountered in intensive care units (ICUs) worldwide such as acquired pneumonia and bacteremia but also urinary tract infections, meningitis and infections of traumatic wounds (1–5). Carbapenems are used as the first-line treatments for *A. baumannii* infections (6). However, due to the increase of *A. baumannii* strains resistant to

carbapenems, other antibiotics must therefore be used such as polymyxins (colistin (CST) and polymyxin B (PMB)) as last-line treatments (1, 6).

Some infections, like ventilator-acquired pneumonia, are characterized by a bacterial burden that could be higher than 10^6 CFU/mL (7). These high bacterial densities could affect antibiotherapy success due to the inoculum effect (IE) (7–9), reducing the antibiotic activity as a function of bacterial density (10, 11). This phenomenon was widely described *in vitro* for ß-lactams against ß-lactamases-producing bacteria such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* (10–13). It was also reported *in vitro* with other antibiotic classes comprising glycopeptides against *Staphylococcus aureus* (14), fluoroquinolones against *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (15), aminoglycosides against *S. aureus* and *E. coli* (16) or polymyxin B against *P. aeruginosa* (17). We previously observed, for the first time, an IE for PMB against *A. baumannii* using *in vitro* static time-kill experiments and PKPD modeling (submitted: AAC01789-21). The IE was characterized by an increase by a factor 17 of the PMB concentration producing 50% of maximal effect (EC_{50}) in the presence of the highest inoculum (10^8 CFU/mL) compared to the lowest one (10^5 CFU/mL).

The *in vivo* IE of *A. baumannii* on polymyxins is a phenomenon that deserves to be investigated. Indeed, Lin *et al* observed a difference in the efficacy of nebulized colistin when the initial inoculum of *A. baumannii* varied (18). The IE was investigated in only few *in vivo* studies for different antibiotics such as marbofloxacin (19), piperacillin-tazobatam (11), ertapenem (20), daptomycin (21), meropenem (15) or colistin (22) against pathogens such as *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* or *P. aeruginosa*. In these *in vivo* studies, the impact of inoculum size was evaluated on bacterial counts at 24 or 48 hours after the start of antibiotic therapy (11, 19–21, 23), or on the survival of infected animals (15, 22). However, to our knowledge, no PKPD modeling of the impact of inoculum size on antibiotic activity has been performed *in vivo*.

Therefore, our objective was to evaluate the impact of inoculum size of *A. baumannii* on PMB activity by using PKPD modeling approaches in the neutropenic murine lung and thigh infection models.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and bacterial isolates

Polymyxin B sulfate (PMB) and cyclophosphamide monohydrate obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France) were used to prepare solutions in sterile conditions. During this study, all chemicals and reagents used were analytical grade.

A clinical strain of *A. baumannii* (CS01), isolated from a patient with a meningitis (Seville, Spain) before treatment with CST, was used during this study (24). Before each experiment, the strain was cultured in 5 mL of Muller-Hinton broth II cation adjusted (MHB) (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) and incubated overnight at 37 ± 2 °C with constant shaking (150-170 rpm). This overnight suspension was diluted to the 50th in MHB with a final volume of 10mL and was incubated with constant shaking at 35°C during 2 h until an OD of 0.29 (Ultrospec10, Biochrom Ltd, Cambridge, United Kingdom), for lung infection the bacterial suspension was incubated until an OD of 0.29 was achieved, corresponding to a bacterial density of 2 x 10^8 inoculum in exponential growth phase). The bacterial suspension was centrifuged (3000 rpm, 6 min), broth was removed and replaced by the same volume of sterile saline solution. For the thigh infection model, a bacterial suspension with an OD of 0.26 was used, corresponding to a bacterial density of 1 x 10^8 CFU/mL in exponential growth phase. The bacterial suspension was centrifuged, broth was removed and replaced by the same volume of sterile saline solution. This suspension was then diluted to obtain a second inoculum of 1 x 10^7 CFU/mL.

Neutropenic mouse lung and thigh infection model.

Animal experiments were carried out according to the EC Directive 2010/63/EU. They were approved by the local ethics committee (COMETHEA) and registered by the French Minister of Higher Education and Research (approval numbers: 2019022216097190 and 2017072415099072). Five-week-old male Swiss RjOrl mice weighing 34 ± 2 g (mean ± the standard deviation [SD]) were obtained from Janvier Labs (Saint-Berthevin, France). All animals were acclimatized in ventilated rack in temperature-regulated environment with a 12h light-dark cycle, with free access to food and water for a minimum of 5 days before the beginning of the experiment. Neutropenia was induced by intraperitoneal administrations of cyclophosphamide at 150 and 100 mg/kg, 4 days and 1 day prior to experimental infection, respectively (25). Lung infection was induced in mice, briefly anesthetized by inhalation of a mixture of isoflurane (3%) and oxygen (Compact anaesthesia module Minerve, Esternay, France) for 5 to 8 minutes, and placed on a support in a vertical upright position with an angle around 30° from the horizontal. Mice were infected by intratracheal administration of the bacterial suspension (0.05 mL of $2x10^7$ or $2x10^8$ CFU/mL, corresponding to 10^6 and 10^7 CFU/lung) using a curved 24G cannula (≈25-30°) attached to a syringe. Mice were then held upright for 1 min, and then were replaced in their cage for recovery from anaesthesia. Thigh infection was induced by intramuscular administration of 0.1 mL of the bacterial suspension of 10^7 CFU/mL or 10^8 CFU/mL (corresponding to 10^6 and 10^7 CFU/thigh, respectively), into one of the posterior thigh muscles.

Polymyxin B treatment

Two hours after bacterial inoculation, mice received either a single subcutaneous administration of PMB (5 or 40 mg/kg in the lung infection model and 1, 15 or 40 mg/kg in the thigh infection model), or a subcutaneous administration of saline solution (control group).

PMB pharmacokinetics.

The PK of PMB was determined in neutropenic infected mice presenting thigh infection with the lowest bacterial inoculum size (10^6 CFU/thigh). Mice were anesthetized by isoflurane (AbbVie, Rungis, France) inhalation (3%) for 5 minutes at each sampling time. Blood samples were collected by intracardiac puncture into heparinized tubes up to 24h after PMB administration for a total of 7 time points per dose level (n=3 animals per time point). Plasma was separated to the whole blood after centrifugation at 4000 rpm for 10 min at 4°C and divided into two samples. The first sample was used to determine total PMB concentrations

and the second one (0.15 mL) was ultrafiltered (4000rpm for 30 min) using Centrifree® ultrafiltration devices from Millipore (Merck KGaA) to determine unbound PMB concentrations and consequently protein binding. The non-specific binding of PMB to the membrane of the Centrifree® ultrafiltration devices (26) was determined by ultrafiltration of PMB solutions in phosphate buffer at concentrations ranging from 0.2 to 7.5 mg/L and was used to correct ultrafiltrate concentrations. Plasma samples and ultrafiltrates were stored at -20°C until analysis. Total and unbound PMB concentrations were determined by a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LS-MS/MS) method (Supplemental material).

PMB pharmacodynamics.

Mice were sacrificed just prior to the start of the therapy or 2, 4, 6, 8 or 24h after PMB administration (n=3-6 animals per time point). Lungs and thigh muscles were collected and homogenized with 1 mL of sterile saline solution using potters Elvehjem-type tissue grinders (Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Homogenates were serially diluted in saline, plated on Muller-Hinton agar plates (Biomérieux) and incubated overnight at 37°C. Bacterial colonies were counted and expressed as $\log_{10}$ numbers of CFU/lung or CFU/thigh. The lower limit of counting was set to 800 CFU/mL corresponding to 2.9 $\log_{10}$ CFU/lung or CFU/thigh.

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic model

A PK-PD model was developed in two steps to quantify the exposure-effect relationship of PMB in infected mice: first, time courses of total and unbound PMB concentrations were modeled and then, PK parameters were fixed to fit bacterial counts.

Different structural models including one, two or three compartments, linear, nonlinear (Michaelis-Menten) or parallel linear/nonlinear elimination were evaluated to describe PK data. Models with linear and nonlinear absorption were also tested. Additive, proportional and exponential residual error models were explored. The structural model for the bacterial population included one compartment representing drug-susceptible growing bacteria. A logistic function was used to model the self-limiting growth observed *in vivo*, such as:

$$\frac{dB}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{B}{Bmax}\right) \times B \qquad \text{(Equation 1)}$$

Where, B (CFU/thigh) is the susceptible bacterial population, K_{net} (h^{-1}) is the apparent (net) growth rate constant and B_{max} (CFU/thigh) the maximum bacterial count reached in the tissue. The residual error was additive on a log scale for bacteria counts (log_{10} CFU/thigh).

Predicted unbound plasma concentrations were linked to the bacterial sub-model using a mathematical function to characterize PMB antimicrobial effect (K_{PMB}) such as:

$$\frac{dB}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{B}{B_{max}}\right) \times B - K_{PMB} \times B \qquad \text{(Equation 2)}$$

Where multiple functions (linear, power, basic E_{max} or a sigmoidal E_{max} function) for K_{PMB} were tested.

The impact of the inoculum size on PMB bactericidal activity was modeled as a decrease of K_{PMB} with increasing starting inoculum using an empirical function (linear, exponential, or power function).

Model selection was based on objective function value (OFV), relative standard errors (RSEs) of the parameter estimates and goodness of fit (GOF) plots. When two models were nested,

a decrease in OFV of at least 3.84 (chi square 1df p = 0.05) was needed to select the most complex model. Visual predictive checks (VPCs) based on 1000 simulations were drawn after stratification on the PMB dose and the starting inoculum to evaluate the predictive performance of the model and were taken into account for model selection. Data below the LOQ were taken into account in the model estimation by applying Beal's M3 method (27). Parameter estimation was performed using NONMEM software (ICON, Dublin, Ireland) version 7.4.2 using the LAPLACIAN algorithm.

RESULTS

1. Polymyxin B pharmacokinetics study

A non-linear decrease in non-specific binding to the membrane of ultrafiltration devices with PMB was observed (Fig. S1) and could be described by the following equation:

$$NSB = 0.47-0.16*LN(UF) \quad \text{(Equation 3)}$$

With NSB, the non-specific binding and UF, PMB concentrations in ultrafiltrates. Equation 3 was used to correct ultrafiltrates concentrations, such as:

$$\text{Unbound concentrations} = \frac{UF}{1-NSB} \quad \text{(Equation 4)}$$

Total and unbound plasma PMB concentration versus time profiles in thigh-infected mice are shown on Fig. S2. PK profiles of unbound concentrations in mice receiving a subcutaneous dose of 1 mg/kg were not represented since these concentrations were all below the LOQ (unbound LOQ = 0.62 mg/L after correction by the non-specific binding). Total peak concentrations (C_{max}) were smoother and delayed as the dose increased, with a time to peak (T_{max}) of 0.5 h for a dose of 1 mg/kg and 2 h for a dose of 40 mg/kg. Moreover, total PMB C_{max} was not proportional to the dose administered, with a 15-fold increase of C_{max} only (from 0.92 ± 0.14 (mean ± SD) to 13.75 ± 0.81 mg/L) when the dose increased from 1 to 40 mg/kg, indicating some degree of non-linearity in the PK across the range of PMB subcutaneous doses used.

Total and unbound plasma PMB concentrations versus time were best fitted by a two-compartment model with saturable absorption from the subcutaneous injection site and linear elimination (Fig. 1). Parameter estimates with their corresponding uncertainties are summarized in Table 1. The protein binding of PMB in plasma of neutropenic infected mice was concentration independent within the range of observed total concentrations (0.20 – 14.25 mg/L). An unbound fraction of PMB in plasma of 17% was estimated by the model (Table 1) and was used to fit unbound concentrations. GOF plots (Fig. S3) and VPCs (Fig. 2) demonstrate that the selected model adequately predicts the mean tendency and dispersion of the total plasma data across the studied dose range. For unbound concentrations, the model slightly both overestimates and underestimates peak concentrations at 15 and 40 mg/kg, respectively (Fig. S3).

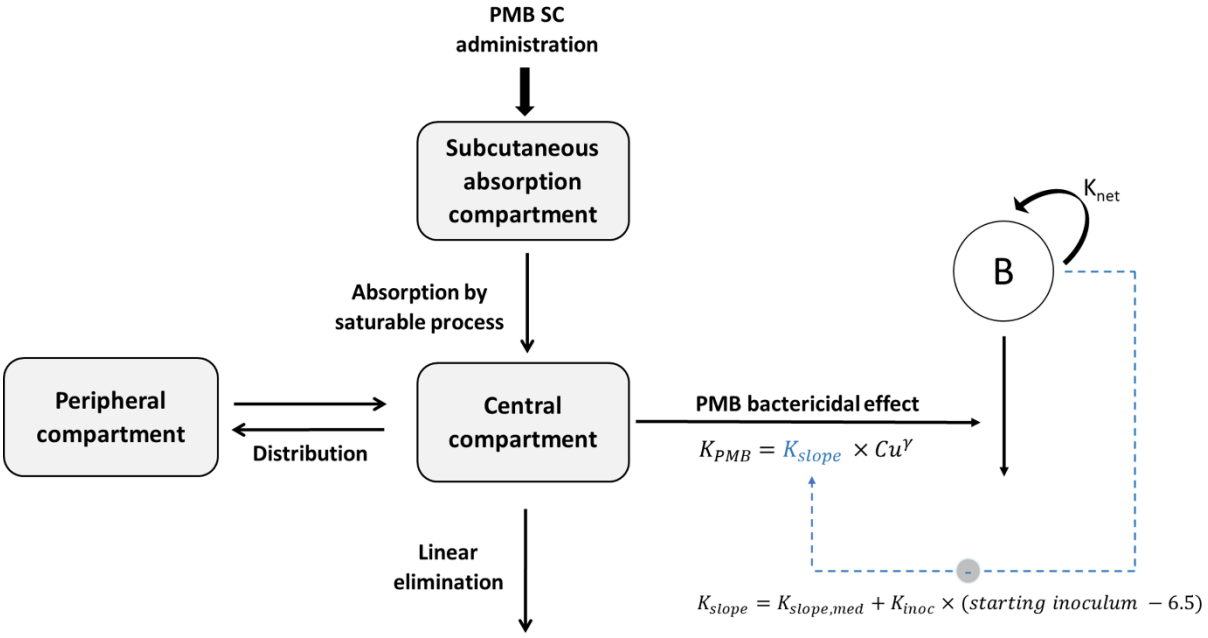


Figure 1. Schematic representation of the final PMB PK-PD model. SC, subcutaneous; K_{net}, apparent growth rate constant of bacteria

Table 1. Parameter estimates and relative standard errors for the final PK models

Parameter	Unit	Estimates (%RSE)
Maximum absorption rate	mg/h/kg	14.7 (9.2)
Amount in the subcutaneous compartment that produces 50% of the maximum absorption rate	mg/kg	2.24 (42.1)
Clearance	L/h/kg	0.437 (3.7)
Distribution volume of the central compartment	L/kg	0.740 (13.1)
Distribution volume of the peripheral compartment	L/kg	0.743 (17.2)
Intercompartmental clearance	(L/h/kg)	0.315 (28.6)
Fraction unbound	-	0.166 (9.3)
Proportional residual error for total concentrations	%	24 (10.5)
Additive residual error for total concentrations	mg/L	0.0115 (51.1)
Proportional residual error for unbound concentrations	%	35 (11.8)
Additive residual error for unbound concentrations	mg/L	0.0457 (47)

RSE, Relative Standard Error

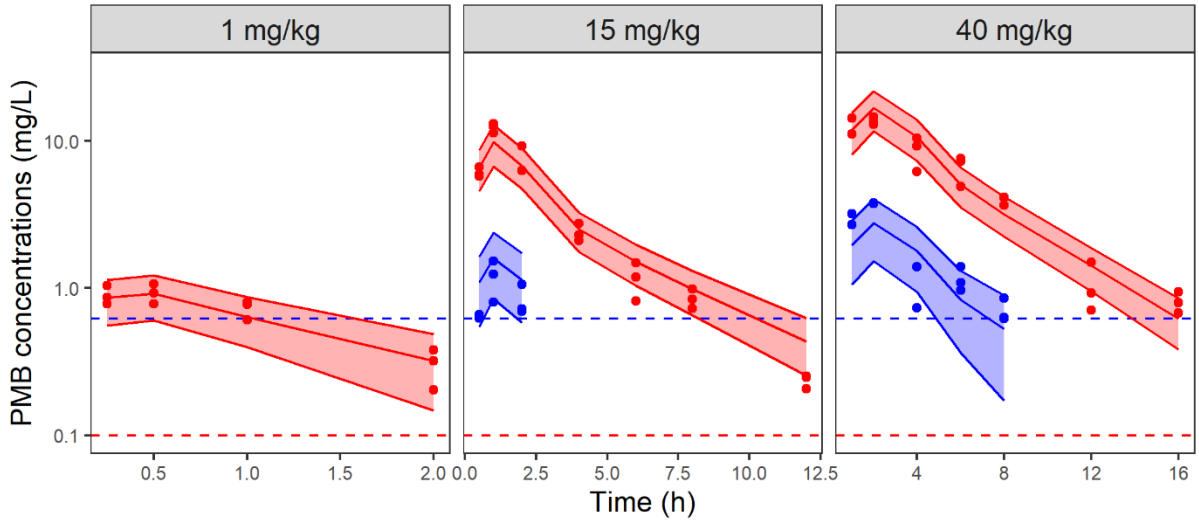


Figure 2. VPCs of the final PK model for total (red) and unbound (blue) PMB plasma concentrations, stratified by dose. Circles represent observed data, solid lines represent the median of the simulations and the colored-shaded areas depict the 80% prediction intervals for 1000 simulated profiles. Dashed lines correspond to the limits of quantification (0.1 mg/ and 0.62 mg/L for total (red) and unbound (blue) concentrations, respectively). Note the different axis scales.

2. Polymyxin B pharmacodynamic study

For the lung infection, at 10^6 CFU/lung inoculum, no reliable infection at 24h was obtained. Consequently, only results obtained with the highest inoculum (10^7 CFU/lung) are presented below and in Fig. S4. In infected control mice, the bacterial density in lung increased from 8.1 ± 0.9 $\log_{10}$ CFU/lung to 9.2 ± 0.3 $\log_{10}$ CFU/lung at 24h. Moreover, no significant bacterial decrease was observed whatever PMB doses administered.

In the thigh infection model, all infected animals in the control groups survived after 24h. The time courses of bacterial loads after a single dose of PMB at 15 and 40 mg/kg are shown in Fig. 3 for both inocula. At the start of PMB treatment, bacterial densities were equal to 7.1 ± 0.5 and 8.0 ± 0.5 $\log_{10}$ CFU/thigh in mice infected with the 10^6 and the 10^7 CFU/thigh inoculum, respectively. The bacterial density in the untreated control group increased until a plateau was reached 8h (8.3 ± 0.3 $\log_{10}$ CFU/thigh) and 4h (8.9 ± 0.1 $\log_{10}$ CFU/thigh) after infection

with the 10^6 and 10^7 CFU/thigh inoculum, respectively. When mice were infected with an inoculum of 10^6 CFU/thigh and treated with PMB at 1 mg/kg, no differences in bacterial density with the control group were observed (data not shown). A moderate efficacy of PMB was observed at 15 mg/kg for the two inocula (Fig. 3). In contrast high reductions of 3.5 ± 0.9 and 2.1 ± 1.4 $\log_{10}$ CFU/thigh were observed 24h after administration of 40 mg/kg PMB, for 10^6 and 10^7 CFU/thigh inocula respectively.

3. Polymyxin B PK-PD study

The time course of bacterial counts was adequately described by the model depicted on Fig. 1. Parameter estimates with their corresponding uncertainties are summarized in Table 2. VPCs of the final model are shown on Fig. 3 and GOF plots on Fig. S5. PMB bactericidal effect (K_{PMB}) was best described by a power function:

$$K_{PMB} = K_{slope} \times Cu^{\gamma} \qquad \text{(Equation 5)}$$

Where k_{slope} corresponds to the kill rate constant due to PMB (L/mg.h), C_u the unbound PMB concentration and γ, the power parameter for PMB effect.

The inoculum effect was incorporated in the model as a decrease of K_{slope} with increasing theoretical starting inoculum using a linear function:

$$K_{slope}=K_{slope,med} + K_{inoc}\times(\text{starting inoculum}-6.5) \qquad \text{(Equation 6)}$$

Where $K_{slope,med}$ is the kill rate constant for a theoretical starting inoculum of 6.5 $\log_{10}$ CFU/thigh corresponding to the median of the starting inoculum tested in the present study (6 or 7 $\log_{10}$ CFU/thigh) and K_{inoc} is the constant describing the inoculum effect on K_{slope}.

A decrease of K_{slope} from 1.78 to 1.52 L/mg.h was predicted for a starting inoculum increasing from 6 to 7 $\log_{10}$ CFU/thigh respectively. K_{PMB} of various PMB concentrations was derived from Equation 5, using for each starting inoculum the corresponding K_{slope} value, and converted into

initial killing half-lives (IK-HL) (Table 3), as previously performed from the *in vitro* model (submitted: AAC01789-21).

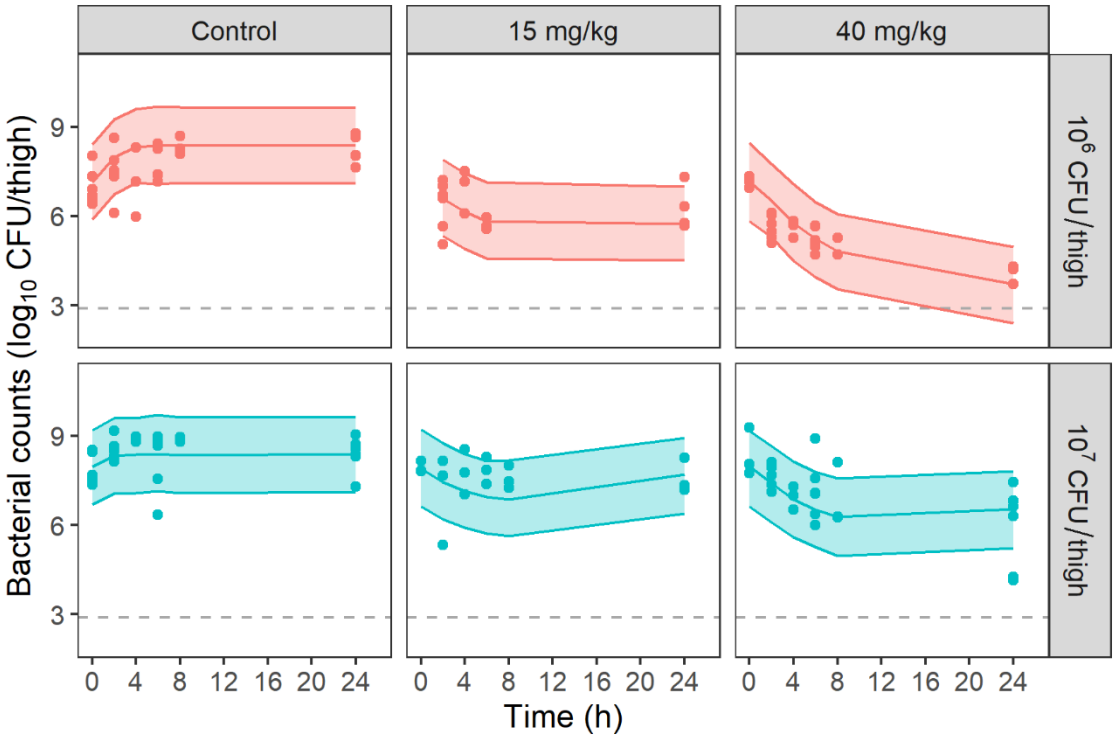


Figure 3. VPCs of the final PKPD model for bacterial counts, stratified by dose of PMB and starting inoculum. Circles represent experimental data, solid lines the median of simulated data and, colored areas depict the 80% prediction intervals for 1000 simulated profiles. Dashed lines correspond to the limit of quantification (2.9 log10 CFU/thigh).

Table 2. Parameter estimates and relative standard errors (RSE) for the final PMB PK-PD model

K_{net}: Apparent growth rate constant	/h	1.18 (14.2)
B_{max}: Maximum bacterial count reached in the tissue	Log_{10} CFU/thigh	8.39 (1.6)
$K_{slope,med}$: Kill rate constant due to PMB for a theoretical median starting inoculum of 6.5 log_{10} CFU/thigh	L/mg.h	1.65 (12.2)
γ: Power parameter for PMB effect	-	0.127 (14.7)
K_{inoc}: Constant describing the inoculum effect on $K_{slope,med}$	-	-0.267 (29.4)
σ: Additive residual error on the log_{10} scale for total bacterial count	Log_{10} CFU/thigh	0.978 (23.5)

Table 3. Model derived initial killing half-lives (min) at various unbound PMB concentrations and starting inocula

PMB concentrations(mg/L) / **Inocula (CFU/thigh)**	0.5	1	2	3	4
10^6	25	23	21	20	20
10^7	30	27	25	24	23
Ratio between 10^7 and 10^6	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the impact of *A. baumannii* inoculum size on PMB efficacy in a murine neutropenic thigh and lung infection models by PKPD modeling.

Concerning pharmacokinetics, a saturable absorption was predicted by our model to describe the non-linear PK of PMB, which is consistent with previous results obtained in neutropenic mice infected with *K. pneumoniae* (25). However, contrary to Landersdorfer *et al.,* it was not necessary to add a saturable elimination to improve performance of the model. In the present study, the PMB unbound fraction in plasma of neutropenic infected mice (0.17) was almost twice as high as previously reported (0.086) (25), but methods used for PMB protein binding determination were different between these studies. In the present one, the PMB protein binding was estimated after ultrafiltration while, in Landersdorfer's study, it was determined by ultracentrifugation of spiked plasma collected from untreated infected neutropenic mice (25). This last methodology may be more suitable for the determination of protein binding of drugs, such as PMB, that exhibit significant nonspecific binding to laboratory material (28). Nevertheless, the non-specific adsorption of PMB to ultrafiltration membranes was taken into account in our study by the correction of the unbound concentrations by nonlinear binding of PMB to the membrane of devices (Fig. S1) (Equations 3 and 4). Finally, the PK study was conducted in neutropenic mice infected with the low inoculum (10^6 CFU/thigh) which assumes that the PK of PMB would not differ as a function of the inoculum. This assumption allows minimizing the number of animals but represents a limitation of our study. Indeed, an increase of elimination half-life of marbofloxacin was previously observed for a high inoculum (10^8 CFU/thigh inoculum) compared to a lower one (10^5 CFU/thigh inoculum) in a murine *E. coli* tight infection model (19). The proposed explanation has been an overproduction of endotoxins at high inoculum that would decrease the elimination pathways of marbofloxacin (renal and/or metabolic), which could be observed with polymyxin.

Pharmacodynamics of PMB against CS01 was initially investigated in a lung infection model using an initial inoculum of 10^7 CFU/lung. This high bacterial inoculum was needed to establish

a reliable lung infection over 24h, as previously reported with other *A. baumannii* strains (18). Consequently, the pulmonary infectious model with the low inoculum (10^6 CFU/lung) was dropped. At 10^7 CFU/lung, no bacterial killing was observed in lung even after administration of the highest tolerated PMB dose (40 mg/kg) (Fig. S4). Several studies, in neutropenic mice, also reported a lack of antibacterial effect of PMB following subcutaneous and intraperitoneal administrations in *K. pneumonia* and *A. baumannii* lung infectious models, respectively (25, 29). The lack of PMB efficacy in lung infections was attributed to the relatively low concentrations achieving the epithelial lining fluid after systemic administration. Therefore, the inoculum effect of *A. baumannii* against PMB was not studied in lung in the present study.

In the thigh infection model, a small *in vivo* IE of *A. baumannii* on PMB antimicrobial activity has been demonstrated (Fig. 3). However, the interindividual variability, especially following the dose of 40 mg/kg, appears to limit this effect. Yet the most innovative aspect of this study was the development of a PKPD model, based on the model developed after *in vitro* TK experiments conducted with *A. baumannii* and PMB (submitted: AAC01789-21). The comparison between PD parameter values obtained after *in vitro* and *in vivo* data fitting indicated that the apparent growth rate constant was slightly lower *in vivo* (1.18 h^{-1}) (Table 2) than *in vitro* (1.62 h^{-1}) (submitted: AAC01789-21), as previously shown for *E. coli* (30) *and P. aeruginosa* (31). The different growth behavior between *in vitro* and *in vivo* has been associated in literature to the different environmental conditions, with nutritional factors more abundantly available *in vitro* than *in vivo* leading to a medium favorable to bacterial growth (32, 33). This phenomenon could produce changes in the composition of the bacterial cell envelope and explain the reduced PMB killing effect *in vivo* (34). As an illustration, the bactericidal effect of PMB characterized by the typical killing rates (K_{PMB}), described by a power function in *vivo* and by a sigmoid Emax model *in vitro*, were respectively equal to 2.0 h^{-1} and 5.9 h^{-1} for initial inocula of $10^{6.5}$ CFU/thigh and $10^{6.5}$ CFU/mL and PMB concentration of 4 mg/L, that corresponds almost to the unbound peak concentration of PMB after a dose of 40 mg/kg. Similarly, a two times smaller maximum killing effect was previously observed for piperacillin against *E. coli* in a murine thigh infection model as compared to *in vitro* (30).

In both *in vitro* and *in vivo* PKPD models, a decrease in PMB killing effect was related to the baseline inoculum and was modeled either as a decrease of the *in vivo* PMB killing rate constant (K_{slope}) or as an increase of the *in vitro* PMB EC_{50}, making PMB IE difficult to compare between *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* initial killing half-lives (IK-HL) were derived from Equation 5 for each starting inoculum and various PMB concentrations to better illustrate the consequences of IE on PMB activity (Table 3). In the present study, the modelling suggests that the *in vivo* IE is moderate and not concentration dependent with an IK-HL 20% higher at 10^7 CFU/thigh compared with 10^6 CFU/thigh inoculum whatever PMB concentration. This moderate IE could be observed only at 24h after the subcutaneous administration of the highest dose (40 mg/kg) where a mean difference of 1.4 $\log_{10}$ CFU/thigh was observed between both inocula (Fig. 3). In contrast, our *in vitro* model suggested that the IE varied according to the concentration of PMB and was attenuated at high PMB concentration (submitted: AAC01789-21). As an example, at a PMB concentration equal to 4 mg/L, *in vitro* IK-HL increased by 33% (from 6 to 8 min) when the starting inoculum increased from 10^6 to 10^7 CFU/mL, whereas it increased by 60% (from 15 to 24 min) for a PMB concentration 16 times lower (0.25 mg/L). The clinical relevance of *in vitro* IE has been also questioned in previous studies (20, 22, 23). Indeed, an increase of *in vivo* dose, suggested by an increase of cefepime (23) and ertapenem MICs (20) against *E. coli* at 10^7 CFU/mL compared to 10^5 CFU/mL, was not necessary to maintain efficacy between these two inocula. On the other hand, Fantin et al. showed that the increase of colistin MIC with the inoculum was translated *in vivo* into a significant decrease in colistin antibacterial effect in peritoneal fluid and spleen, an increased selection of resistant mutants, and an increased mortality in mice infected with a 10-fold higher bacterial load of *E. coli* (10^8 versus 10^7 CFU/mouse) (22). In the present study the *in vivo* IE is lower than the *in vitro* one, however the small difference between the two *in vivo* inocula (10^6 and 10^7 CFU/thigh) combined with the high interindividual variability (Fig. 3), could explain this difference. Thus, the use of a lower inoculum could help to a better appreciation of the IE, as suggested by the model simulations conducted with an inoculum of 10^5 CFU/thigh (Fig. S6). These additional experiments are currently ongoing.

In conclusion, a PKPD model has been successfully developed to characterize the *in vivo* IE of *A. baumannii* on PMB. The PKPD model previously developed from *in vitro* TKC data was slightly modified to take into account the intrinsic differences between *in vitro* and *in vivo* experimental infection models. Although the comparison between *in vitro* and *in vivo* PKPD parameters was not straightforward, the initial inoculum size of *A. baumannii* appeared to have less impact on PMB activity in the neutropenic thigh infection model than *in vitro*. Nevertheless, further experiments with a lower starting inoculum as well as with more *A. baumannii* strains are needed to confirm these results.

ACKNOLEDGEMENTS

The financial support of G. Akrong was provided by the Nouvelle Aquitaine Region and Inserm. This work had benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

REFERENCES

1. Garnacho-Montero J, Timsit J-F. 2019. Managing Acinetobacter baumannii infections. Curr Opin Infect Dis 32:69–76.
2. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. 2003. Clinical impact of pneumonia caused by Acinetobacter baumannii in intubated patients: A matched cohort study*. Crit Care Med 31:2478–2482.
3. El-Saed A, Balkhy HH, Al-Dorzi HM, Khan R, Rishu AH, Arabi YM. 2013. Acinetobacter is the most common pathogen associated with late-onset and recurrent ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit in Saudi Arabia. Int J Infect Dis 17:e696–e701.
4. García-Garmendia J-L, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez F-J, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE, Miner MG. 2001. Risk Factors for Acinetobacter baumannii Nosocomial Bacteremia in Critically Ill Patients: A Cohort Study. Clin Infect Dis 33:939–946.
5. Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, Menendez R, Bonastre J. 2012. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. Crit Care 16:R93.

6. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. 2017. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. Clin Microbiol Rev 30:409–447.
7. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. 2014. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Crit Care 18:208.
8. Koenig SM, Truwit JD. 2006. Ventilator-Associated Pneumonia: Diagnosis, Treatment, and Prevention. Clin Microbiol Rev 19:637–657.
9. Chastre J, Fagon J-Y. 2002. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 165:867–903.
10. Lenhard JR, Bulman ZP. 2019. Inoculum effect of β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 74:2825–2843.
11. Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Nakamura S, Uno N, Hasegawa H, Izumikawa K, Kohno S, Yanagihara K. 2014. In vitro and in vivo activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae. Clin Microbiol Infect 20:O831–O839.
12. Bedenić B, Beader N, Žagar Ž. 2001. Effect of inoculum size on the antibacterial activity of cefpirome and cefepime against Klebsiella pneumoniae strains producing SHV extended-spectrum β-lactamases. Clin Microbiol Infect 7:626–635.
13. Smith KP, Kirby JE. 2018. The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination. Antimicrob Agents Chemother 62.
14. Rio-Marques L, Hartke A, Bizzini A. 2014. The Effect of Inoculum Size on Selection of In Vitro Resistance to Vancomycin, Daptomycin, and Linezolid in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Microb Drug Resist 20:539–543.
15. Mizunaga S, Kamiyama T, Fukuda Y, Takahata M, Mitsuyama J. 2005. Influence of inoculum size of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. J Antimicrob Chemother 56:91–96.
16. Li RC, Ma HHM. 1998. Parameterization of Inoculum Effect Via Mathematical Modeling: Aminoglycosides Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. J Chemother 10:203–207.
17. Tam VH, Schilling AN, Nikolaou M. 2005. Modelling time–kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. J Antimicrob Chemother 55:699–706.
18. Lin Y-W, Zhou QT, Han M-L, Chen K, Onufrak NJ, Wang J, Turnidge JD, Howden BP, Forrest A, Chan H-K, Li J. 2018. Elucidating the Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Aerosolized Colistin against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae in a Mouse Lung Infection Model. Antimicrob Agents Chemother 62.
19. Ferran AA, Kesteman A-S, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. 2009. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in Escherichia coli by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. Antimicrob Agents Chemother 53:3384–3390.
20. Maglio D, Banevicius MA, Sutherland C, Babalola C, Nightingale CH, Nicolau DP. 2005. Pharmacodynamic Profile of Ertapenem against Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in a Murine Thigh Model. Antimicrob Agents Chemother 49:276–280.

21. Lee D-G, Murakami Y, Andes DR, Craig WA. 2013. Inoculum Effects of Ceftobiprole, Daptomycin, Linezolid, and Vancomycin with Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae at Inocula of 105 and 107 CFU Injected into Opposite Thighs of Neutropenic Mice. Antimicrob Agents Chemother 57:1434–1441.
22. Fantin B, Poujade J, Grégoire N, Chau F, Roujansky A, Kieffer N, Berleur M, Couet W, Nordmann P. 2019. The inoculum effect of Escherichia coli expressing mcr-1 or not on colistin activity in a murine model of peritonitis. Clin Microbiol Infect 25:1563.e5-1563.e8.
23. Maglio D, Ong C, Banevicius MA, Geng Q, Nightingale CH, Nicolau DP. 2004. Determination of the in vivo pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli at various inocula. Antimicrob Agents Chemother 48:1941–1947.
24. López-Rojas R, McConnell MJ, Jiménez-Mejías ME, Domínguez-Herrera J, Fernández-Cuenca F, Pachón J. 2013. Colistin Resistance in a Clinical Acinetobacter baumannii Strain Appearing after Colistin Treatment: Effect on Virulence and Bacterial Fitness. Antimicrob Agents Chemother 57:4587–4589.
25. Landersdorfer CB, Wang J, Wirth V, Chen K, Kaye KS, Tsuji BT, Li J, Nation RL. 2018. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of systemically administered polymyxin B against Klebsiella pneumoniae in mouse thigh and lung infection models. J Antimicrob Chemother 73:462–468.
26. Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. 2012. Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. Diagn Microbiol Infect Dis 74:412–414.
27. Beal SL. 2001. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:481–504.
28. Cheah S-E, Wang J, Nguyen VTT, Turnidge JD, Li J, Nation RL. 2015. New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. J Antimicrob Chemother 70:3291–3297.
29. Bowers DR, Cao H, Zhou J, Ledesma KR, Sun D, Lomovskaya O, Tam VH. 2015. Assessment of minocycline and polymyxin B combination against Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 59:2720–2725.
30. de Araujo BV, Diniz A, Palma EC, Buffé C, Costa TD. 2011. PK-PD modeling of β-lactam antibiotics: In vitro or in vivo models? J Antibiot (Tokyo) 64:439–446.
31. Bonapace CR, Friedrich LV, Bosso JA, White RL. 2002. Determination of Antibiotic Effect in an In Vitro Pharmacodynamic Model: Comparison with an Established Animal Model of Infection. Antimicrob Agents Chemother 46:3574–3579.
32. Gloede J, Scheerans C, Derendorf H, Kloft C. 2010. In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. J Antimicrob Chemother 65:186–201.
33. Mouton JW. 2018. Soup with or without meatballs: Impact of nutritional factors on the MIC, kill-rates and growth-rates. Eur J Pharm Sci 125:23–27.
34. Brown MR, Collier PJ, Gilbert P. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. Antimicrob Agents Chemother 34:1623–1628.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

MATERIEL AND METHOD

LC-MS/MS method

Briefly, 0.1 mL of plasma or 0.05 mL of ultrafiltrates added to 0.05 mL of drug-free plasma, were mixed with 0.75 mL of phosphate buffer (pH 7.2) and 0.01 mL of internal standard (colistin sulfate ; Merck KGaA) at 6.25 mg/L for plasma and 5 mg/L for ultrafiltrates. The samples were briefly vortexed and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatants (0.800 mL) were loaded onto SPE columns (Oasis HLB solid-phase extraction (SPE) cartridges (1 mL, 30 mg), Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), preconditioned with 1 mL of methanol followed by 1 mL of water. Then the columns were washed with 1 mL of water and dried under a nitrogen pressure. The analytes were eluted with 0.5% formic acid in methanol. They were evaporated at 45°C under a gentle nitrogen jet stream. The residues were dissolved in 0.1 mL of 0.1% formic acid in water and analyzed by LC-MS/MS. The system included an Alliance Waters 2695 liquid chromatography system module (Waters) coupled with an API Quattro Micro (Waters). PMB was analyzed on an XBridge C_{18} column (5 µm, 2.1 x 150 mm; Waters). The mobile phase A consisted of 0.1% formic acid in water, and mobile phase B was 0.1% formic acid in acetonitrile. The gradient for mobile phase A and B were respectively set at 75 and 25% with a flow rate of 0.2 mL/min. Electrospray ionization in positive mode was used for the detection of PMB. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring, and the following transitions were inspected: *m/z* 602.1→101 for PMB1, *m/z* 595.1→101 for PMB2, and *m/z* 585.1→101 for CSTA and *m/z* 578.1→101 CSTB. Calibration curves of PMB ranged from 0.1 to 10 mg/L for plasma and ultrafiltrates, and were quantified with a quadratic regression mode. The intraday variability was characterized at four levels (0.3, 1, 2.5 and 10 mg/L) with a precision and bias of <20% for the lowest level, and < 15% for the others.

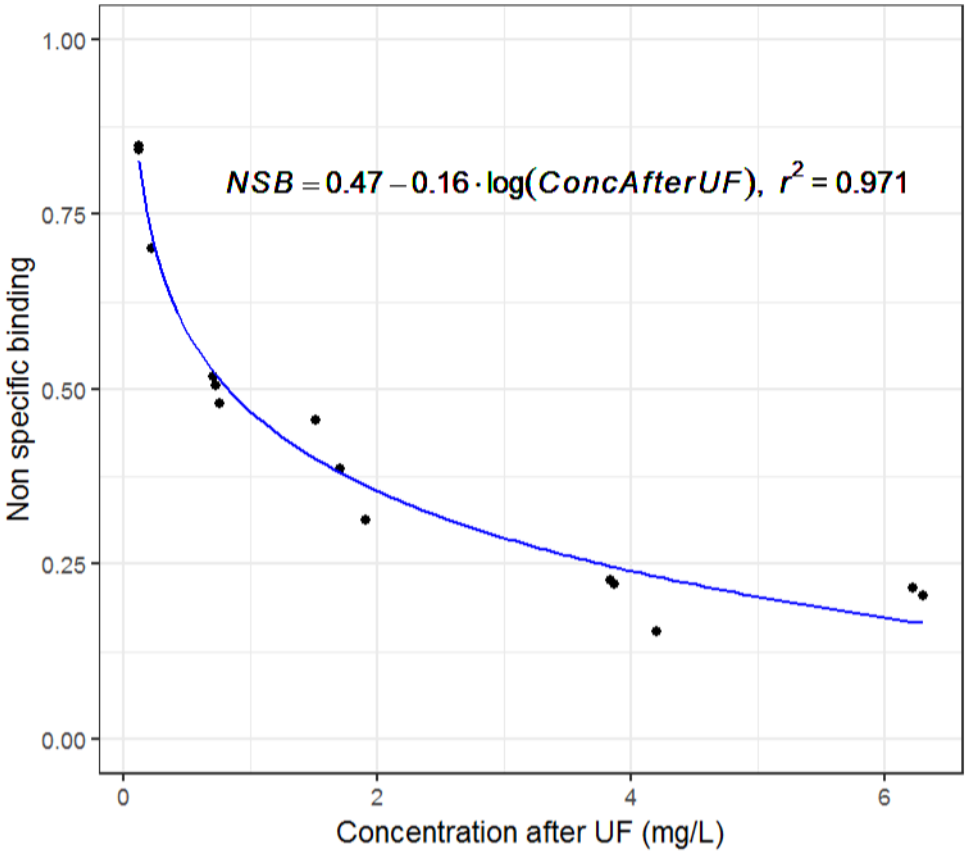


Figure S1. Non-specific binding of PMB versus PMB concentration after ultrafiltration.

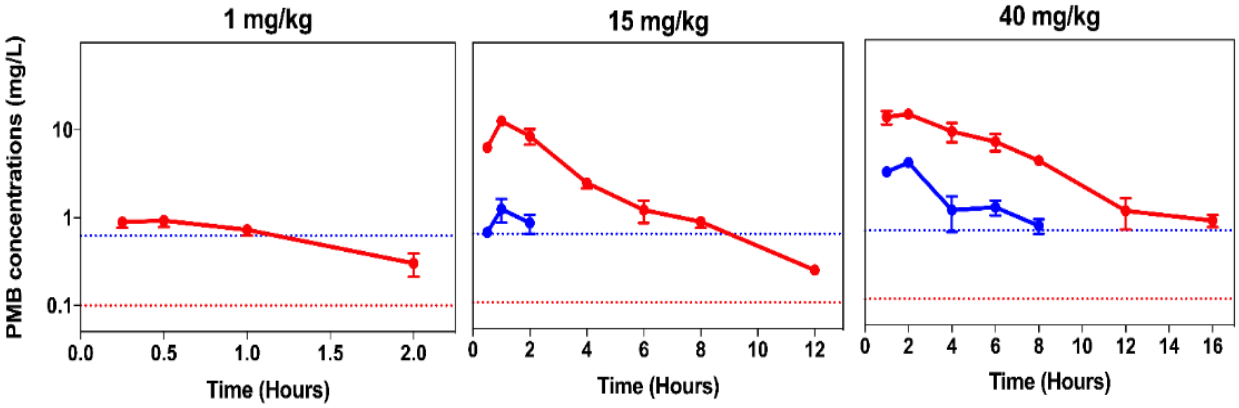


Figure S2. Total (red) and unbound (blue) plasma PMB concentrations versus time after the administration of a single subcutaneous dose of 1, 15 or 40 mg/kg in mice infected with the lower inoculum (10^6 CFU/thigh). Data points represent mean ± SD (n=3 per time point). Dashed lines correspond to the limits of quantification (0.1 mg/L and 0.62 mg/L for total (red) and

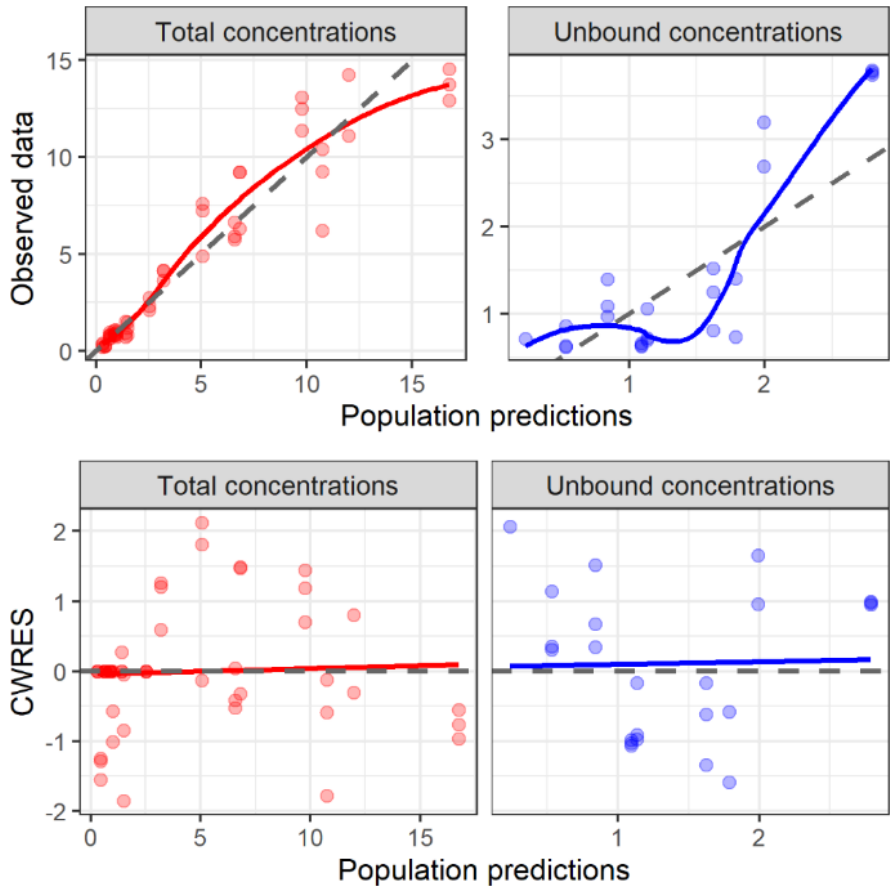


Figure S3. Goodness of fit plots (GOF) of the final PK model for total (red) and unbound (blue) concentrations. A and B: observed data versus population predicted concentrations. C and D: conditional weighted residuals (CWRES) versus population predictions.

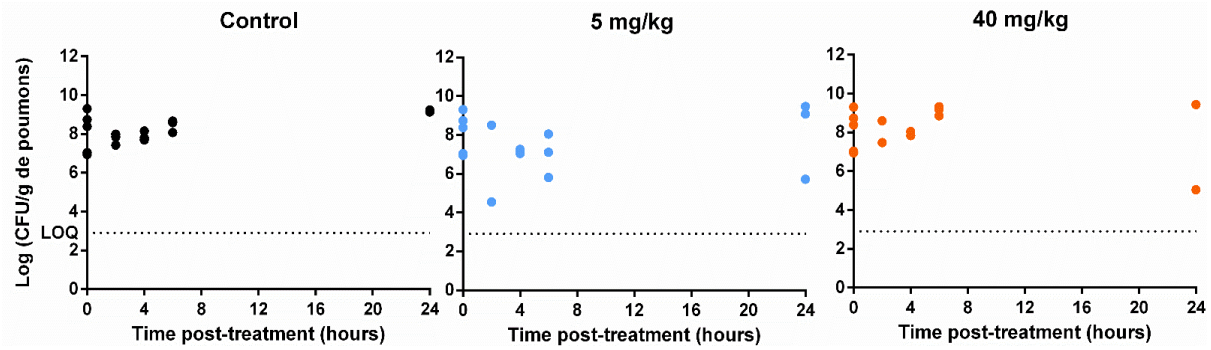


Figure S4. Bacterial counts in lung (log_{10} CFU/lung) with control, PMB at 5 and 40 mg/kg in the *A. baumannii* murine lung infection model at 10^7 CFU/lung.

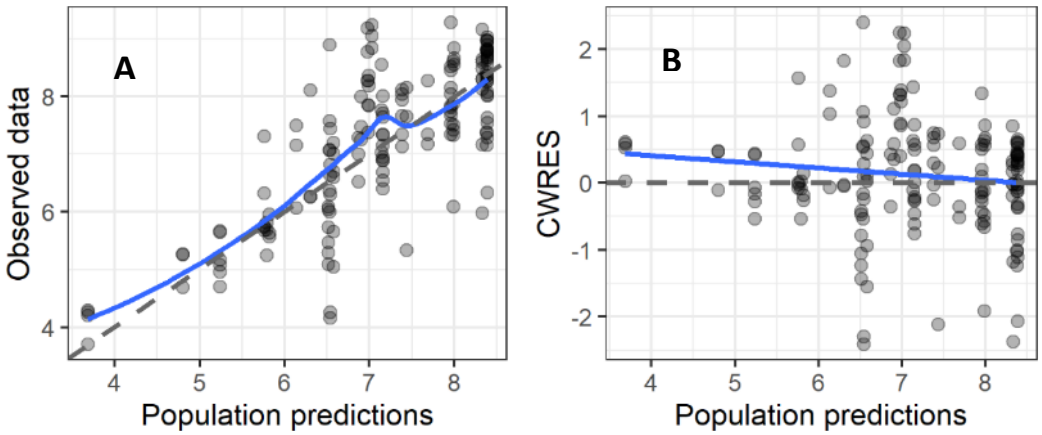


Figure S5. Goodness of fit plots (GOF) of the final PKPD model. A: observed data versus population predicted bacterial counts. B: conditional weighted residuals (CWRES) versus population predictions.

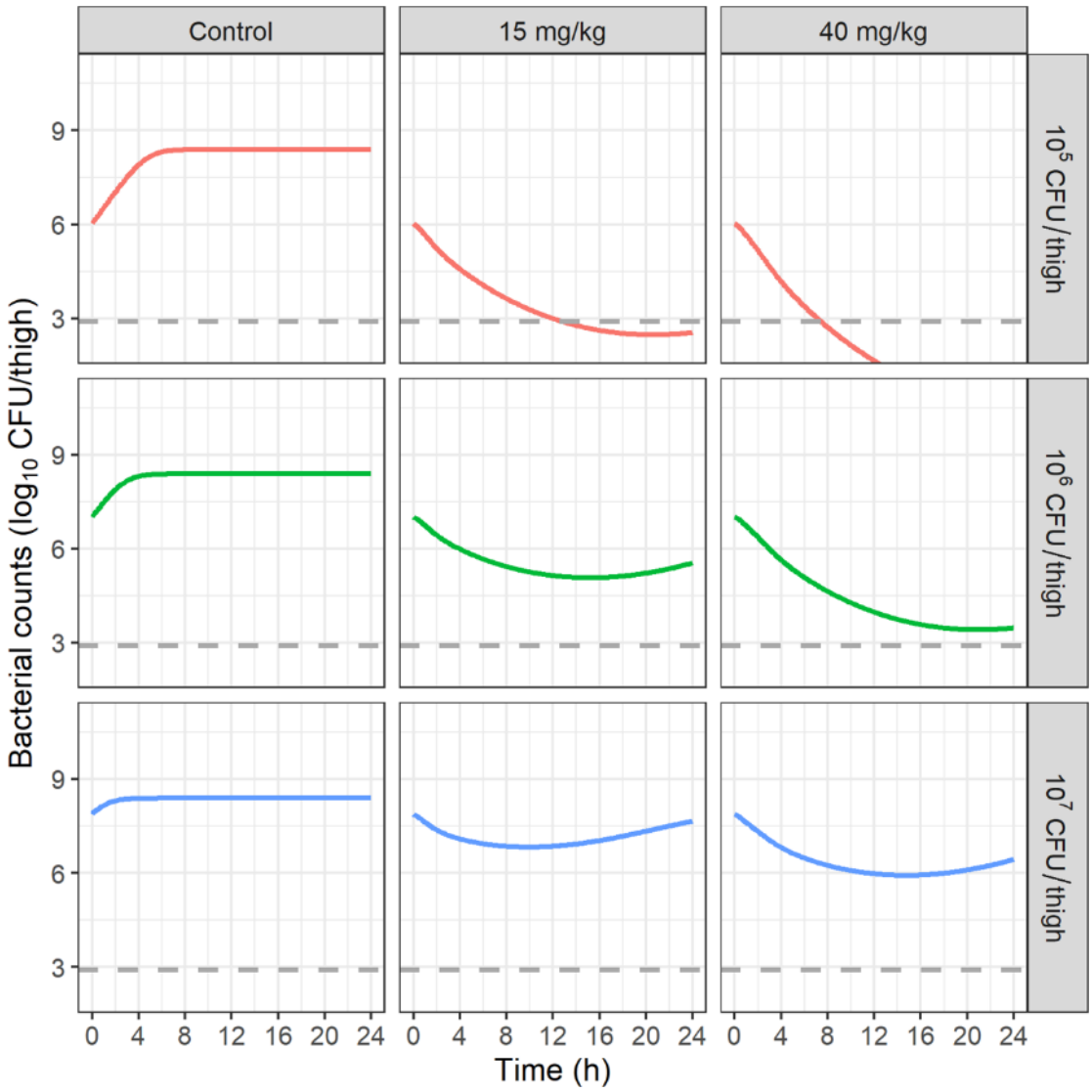


Figure S6. Simulations of expected bacterial count (CFU/thigh) versus time after a single PMB administration at 15 and 40 mg/kg for initial inocula at 10^5, 10^6 and 10^7 CFU/thigh.

DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

La densité bactérienne au site infectieux est l'un des paramètres dont dépend l'efficacité des antibiotiques. En effet, l'EI est un phénomène microbiologique qui désigne la diminution de leur efficacité *in vitro* et *in vivo* en présence d'un fort inoculum (Brook 1989). Cependant, la CMI qui est le paramètre PD classiquement utilisé pour évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, ne tient pas compte de ce phénomène (« M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI » s. d.; « EUCAST: MIC determination » s. d.). Or, les index PK/PD traditionnels utilisés pour optimiser les schémas posologiques des antibiotiques dépendent tous de la CMI (Udekwu et al. 2009; Fantin et al. 2019). Ainsi, la compréhension de la relation entre l'efficacité des antibiotiques et la taille de l'inoculum est essentielle à une bonne utilisation des antibiotiques afin de maximiser leur efficacité et de limiter l'émergence de résistances. L'ensemble de ce travail de thèse s'est focalisé sur l'évaluation de l'impact de la taille de l'inoculum bactérien d'*A. baumannii* sur la pharmacodynamie de la PMB, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, dans le cadre d'un Projet Région Nouvelle Aquitaine intitulé « INPULSE »

La PMB constitue aujourd'hui l'un des traitements de derniers recours utilisés face aux infections causées par les souches d'*A. baumannii* multirésistantes. Ainsi, une étude de bactéricidie *in vitro* par la méthode des TKC statiques a été réalisée afin d'évaluer l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'efficacité de la PMB. L'article 1 a montré que la CMI de la PMB augmentait d'un facteur 10 entre le plus faible inoculum (10^5 UFC/mL) et le plus fort (10^8 UFC/mL). L'EI *in vitro* d'*A. baumannii* observé lors des TKC statiques a été caractérisé, à l'aide d'un modèle PKPD, par une augmentation de l'EC_{50} de la PMB d'un facteur 17 entre ces deux inocula.

Le modèle développé dans ce travail de thèse à partir des données *in vitro* a une structure similaire à celui développé par Bhagunde *et al.* où l'EI est caractérisé par une diminution de la concentration efficace de l'antibiotique (Bhagunde et al. 2010). Il offre l'avantage d'être simple, sans hypothèses mécanistiques et donc facilement transposable à d'autres couples antibiotiques/espèces bactériennes. Le modèle a été initialement développé avec *A. baumannii*, une BGN pour laquelle lors d'expériences *in vitro* de TKC en présence d'antibiotiques, la diminution initiale rapide des UFC est suivie d'une repousse en lien avec la mise en place de mécanismes adaptatifs de résistance (référence de l'article soumis : AAC01789-21). Dans ce cas, l'EI est difficilement dissociable du phénomène d'adaptation. Le modèle a cependant permis de décrire de manière adéquate les données *in vitro* en suggérant

que les deux phénomènes étaient indépendants l'un de l'autre. Afin de s'affranchir de ces phénomènes d'adaptation, une étude de l'EI pour un couple antibiotique/BGP (linézolide/*S. aureus*) est en cours de réalisation au laboratoire. De plus, le modèle PKPD développé dans cette thèse semble être en capacité de décrire des phénomènes d'EI dans des situations plus complexes, comme dans le projet CO-PROTECT (ANR Franco-allemande) visant à étudier les associations ß-lactamines/inhibiteurs de ß-lactamases combinés avec des antibiotiques de dernier recours. Les premiers résultats montrent un faible EI de *K. pneumoniae* lorsque la colistine et l'association ceftazidime/avibactam sont utilisées en monothérapie, effet qui est majoré lors de la combinaison des trois molécules.

Ces exemples posent des questions mécanistiques générales quant à l'origine de l'EI. En ce qui concerne la diminution de l'efficacité de la PMB aux forts inocula d'*A. baumannii*, plusieurs hypothèses ont été émises. L'activité de la PMB pourrait être diminuée en raison de la fixation de celle-ci aux LOS présents en plus grande quantité dans le milieu extracellulaire aux forts inocula. En effet, Yokota *et al.* ont observé que les LOS d' *A. baumannii* présents dans le milieu extracellulaire pouvaient induire une légère diminution de l'efficacité de la CST (Yokota et al. 2018). Un changement phénotypique rendant les bactéries insensibles à la PMB induit par les molécules du *quorum sensing* (les auto-inducteurs) (Bulitta et al. 2010), dont la concentration est dépendante de la densité bactérienne (González, Nusblat, et Nudel 2001), pourrait être également un des mécanismes responsables de l'EI d'*A. baumannii*. Cela pourrait être également dû à une modification de la charge nette de la membrane externe lors de la phase stationnaire de croissance (Soon et al. 2011). En effet, Soon *et al.* ont montré que la membrane externe de différentes souches d'*A. baumannii* (sensibles ou non aux polymyxines) était moins chargée négativement lors de la phase stationnaire de croissance (Soon et al. 2011). On ne peut bien entendu pas exclure que plusieurs mécanismes soient concomitants.

Quelques modèles PKPD semi-mécanistiques caractérisant la relation entre la PD *in vitro* des antibiotiques et la taille de l'inoculum bactérien et reposant sur différents mécanismes (changement d'état physiologique des bactéries*, quorum sensing*…) ont été décrits dans la littérature (E. I. Nielsen et al. 2017; Bulitta et al. 2010; 2009). Toutefois, ces modèles sont complexes et les hypothèses utilisées pour le développement de leurs structures sont difficilement vérifiables. Notre unité Inserm souhaite à l'avenir s'intéresser à ces aspects mécanistiques de l'EI mais en repartant du mécanisme le plus communément décrit dans la

littérature, à savoir l'augmentation de la production de β-lactamases avec la densité bactérienne (Bedenić, Beader, et Žagar 2001; Craig, Bhavnani, et Ambrose 2004; Adler et al. 2015; Harada et al. 2014; Kim et al. 2020; Thomson et Moland 2001; López-Cerero et al. 2010). C'est dans ce but, qu'une étude visant à caractériser l'EI de souches de *K. pneumoniae* produisant des BLSE vis-à-vis de l'association ceftazidime/avibactam a été initiée dans notre laboratoire. Les résultats préliminaires ont montré que selon la souche de *K. pneumoniae* utilisée, une augmentation de la CMI de la ceftazidime seule ou associée avec l'avibactam était observée avec une augmentation de l'inoculum (de 10^5 UFC/mL à 10^8 UFC/mL). Ainsi un modèle PKPD semi-mécanistique est envisagé afin de décrire les données de TKC obtenues pour plusieurs inocula de différentes souches de *K. pneumoniae* en présence de ceftazidime seule ou associée avec de l'avibactam. La structure initiale du modèle, comme illustrée dans la Figure 39, sera un mélange entre le modèle de cette thèse et celui développé pour caractériser la PD de l'association aztréonam/avibactam (Alexia Chauzy et al. 2019) qui dissocie les différents effets de l'avibactam. Ce nouveau modèle semi-mécanistique pourrait permettre de distinguer l'impact de la taille de l'inoculum sur l'effet de la ceftazidime (IE1 bleu sur la Figure 39) et l'impact de la taille de l'inoculum sur la production de BLSE (EI2 bleu sur la Figure 39) qui pourrait rentrer en compétition avec l'effet inhibiteur de l'avibactam (en vert sur la Figure 39).

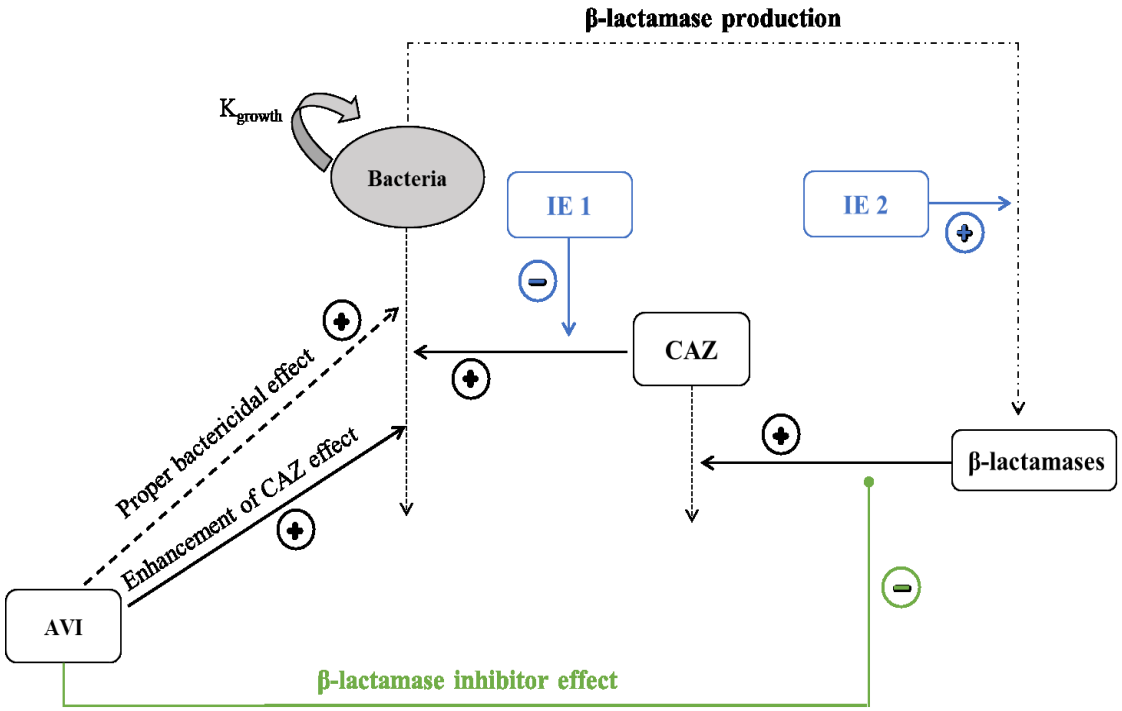


Figure 39. Schéma du modèle PKPD avec deux types d'effet inoclum (IE1 et EI2). Dérivé de (Chauzy et al. 2019)

Par ailleurs, dans ce travail de thèse, une étude de biologie moléculaire a été réalisée en parallèle des TKC statiques *in vitro* afin d'étudier les éventuelles modifications génétiques pouvant induire une résistance à la PMB. L'absence de mutations dans les gènes impliqués dans la résistance aux polymyxines (*pmrCAB, lpxACD* et *wzc)* et l'absence de modification de l'expression de ces gènes, étudiés respectivement par séquençage et RT-qPCR, suggère que les repousses observées lors de TKC *in vitro* ne sont pas dues aux mécanismes de résistance et d'adaptation connus à la PMB. Une analyse en transcriptomique pourrait nous permettre d'identifier des modifications d'expression dans d'autres gènes impliqués. D'autre part, les mutations contrairement aux modifications d'expression de gènes sont des phénomènes aléatoires difficilement appréhendables sur des courtes périodes comme celles utilisées pour les TKC. Une étude en *hollow-fibers*, réalisée sur plusieurs jours, constituerait une méthode plus adaptée à l'étude de l'émergence des résistances *in vitro* (Drusano et al. 2021) et se rapprocherait également, notamment d'un point de vue pharmacocinétique, de la situation observée en clinique.

La taille de l'inoculum bactérien n'a pas seulement un effet sur l'antibiotique, elle peut également avoir un impact sur la réponse immunitaire (Lallemand et al. 2021). En effet, antibiotiques et cellules immunitaires comme les macrophages coopèrent pour favoriser l'élimination bactérienne (Lallemand et al. 2021). Cependant, il a été montré lors d'études *in vitro* que la mortalité des macrophages était augmentée à fort inoculum tandis que leur capacité à tuer des bactéries était diminuée (Lallemand et al. 2021). *A. baumannii* est une bactérie principalement extracellulaire, mais certaines souches cliniques ont montré leur capacité à survivre dans des macrophages murins et humains (Sato et al. 2017). Ainsi la réalisation d'études de TKC statiques (Lallemand et al. 2021) et dynamiques (Srivastava et al. 2015; 2016) tripartites, c'est-à-dire comprenant des bactéries, des macrophages et un antibiotique (dans notre cas, la PMB), permettrait de se rapprocher de la physiopathologie.

Dans la seconde partie de cette thèse, des modèles murins neutropéniques d'infection de la cuisse et du poumon à *A. baumannii* ont été développés afin d'étudier l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'activité de la PMB *in vivo*. Les expérimentations animales ont l'avantage d'offrir une plus grande souplesse que les études cliniques dans lesquelles la pharmacodynamie des antibiotiques aux sites infectieux ne peut pas être étudiée. L'approche utilisée dans cette étude *in vivo* est semblable à celle utilisée par Lee *et al.* où l'impact de la

taille de l'inoculum de 2 souche de *S. aureus* sur la PD de la vancomycine a été évalué par une méthode de « TKC » sur 24 h dans un modèle murin d'infection de la cuisse (D.-G. Lee et al. 2013). Dans notre étude, cette approche a été complétée par une analyse PKPD afin de mieux caractériser l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'activité de la PMB.

Nous avons voulu étudier l'EI dans ces deux modèles infectieux, cependant une infection pulmonaire viable n'a pu être obtenue qu'avec l'inoculum de 10^7 UFC/poumon. De la même manière, des forts inocula d'*A. baumannii*, variant de 10^7 à 10^8 UFC/poumon en fonction de la souche étudiée, ont dû être utilisés afin d'établir une infection pulmonaire viable dans des études précédentes (Y.-W. Lin et al. 2018; Bowers et al. 2015; Cheah et al. 2015). La PD de la PMB a donc été étudiée dans le modèle d'infection pulmonaire à un seul inoculum (10^7 UFC/poumon). L'article 2 a montré que la PMB était plus efficace dans le modèle d'infection de la cuisse que dans le modèle pulmonaire. Cette divergence de résultats entre les deux tissus a également été observée pour d'autres couples antibiotiques/espèces bactériennes, comme PMB/*K. pneumoniae* (Landersdorfer et al. 2018), CST/*A. baumannii* (Cheah et al. 2015) et CST/*P. aeruginosa* (Cheah et al. 2015), et pourrait s'expliquer par une plus faible distribution des antibiotiques dans les poumons que dans les muscles après administration par voie systémique. En effet, des interactions électrostatiques entre la PMB ou la CST, antibiotiques polypeptidiques cationiques (Figure 12), et des polymères anioniques du mucus pulmonaire comme la mucine ou encore l'ADN extracellulaire (eADN) pourraient limiter leur efficacité *in vivo* dans les modèles d'infection pulmonaire (Samad et al. 2019; J. X. Huang et al. 2015).

L'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'efficacité *in vivo* de la PMB a donc été uniquement évalué dans le modèle d'infection de la cuisse. Afin de caractériser cet EI *in vivo*, une approche PK/PD a été utilisée pour analyser les données. Initialement, le modèle PKPD développé pour décrire les données *in vitro* a été appliqué à ces données *in vivo.* Les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants (Figure 40) et la structure du modèle PKPD a été simplifiée avec, contrairement au modèle *in vitro*, un modèle *in vivo* qui suggère que l'EI n'est pas concentration dépendant chez la souris.

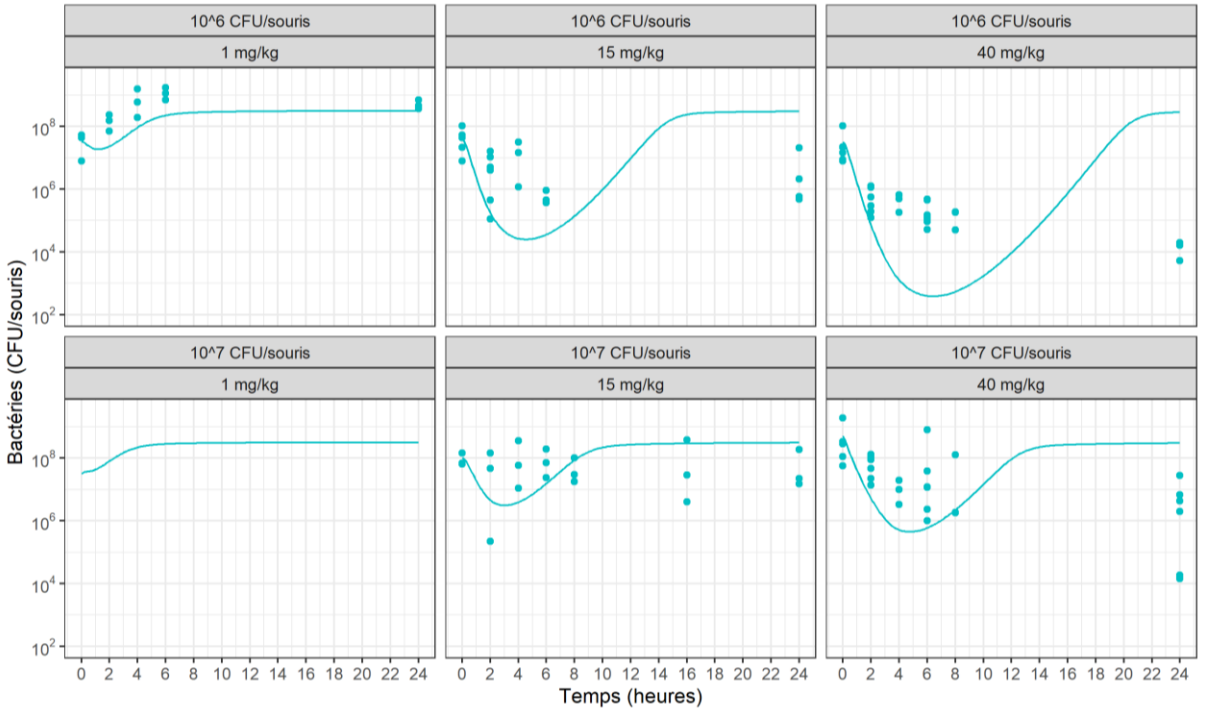


Figure 40. Simulations à partir du modèle in vitro (article soumis : AAC01789-21) du nombre de bactéries (CFU/cuisse) en fonction du temps après une dose unique de PMB (1, 15 et 40 mg/kg) pour des inocula initiaux de 106 et 107 CFU/cuisse. Les cercles pleins représentent les données expérimentales et les traits pleins, les prédictions du modèle.

Par ailleurs, l'EI *in vivo* semble à ce stade de l'étude moins important qu'*in vitro* mais des expériences complémentaires avec un inoculum plus faible à 10^5 CFU/cuisse sont en cours de réalisation afin de confirmer ou d'infirmer ce résultat. Ces résultats divergents ne sont toutefois pas totalement surprenants, en effet un certain nombre d'articles de la littérature montre la difficulté d'extrapoler des résultats *in vitro* à l'*in vivo* (Crandon et al. 2012; Tomaras et al. 2013; Maglio et al. 2004; 2005). Ces divergences résultent bien entendu de phénomènes multifactoriels comme entre autres une quantité de nutriments *in vivo* plus faible qu'*in vitro* limitant ainsi la croissance bactérienne (Mouton 2018). Il va donc être nécessaire à l'avenir de réfléchir à cette problématique qui peut être à l'origine d'une complexification des modèles *in vitro* utilisés afin de se rapprocher des conditions *in vivo*.

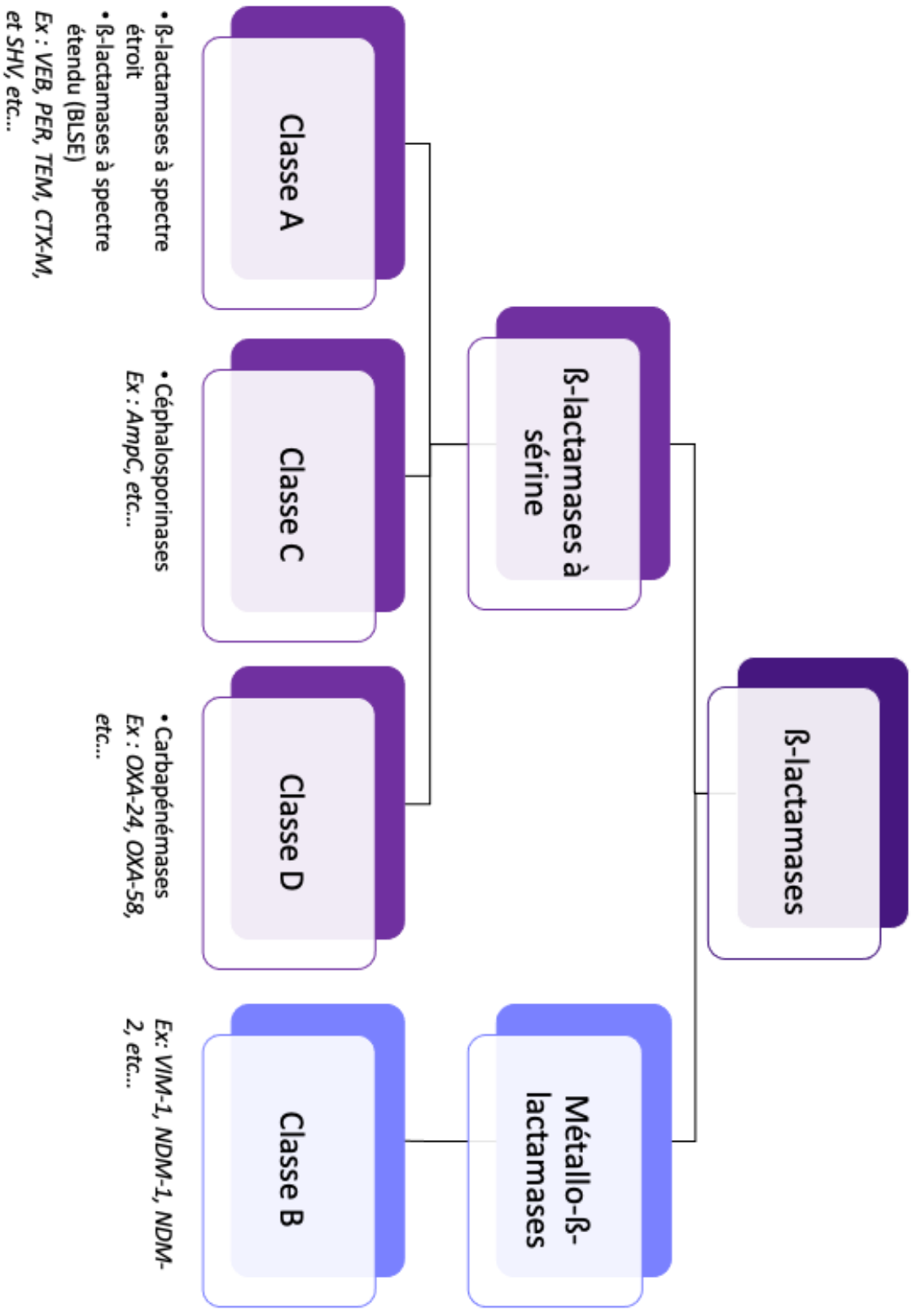
A ce jour, peu d'études ont été menées afin d'évaluer la pertinence clinique d'EI observés *in vitro*. Jusqu'à présent, les études cliniques ont essentiellement porté sur l'utilisation de la céfazoline contre des souches de *S. aureus* sensibles à la méthicilline qui présentaient un EI *in vitro* (S. Lee et al. 2018; Miller et al. 2018), tandis que les études cliniques évaluant l'EI de BGN

sont manquantes. Toutefois, en cas d'infection avec une charge bactérienne élevée, lorsque le pathogène mis en cause est initialement sensible à un antibiotique mais que le patient ne répond pas cliniquement, les cliniciens devraient considérer l'EI comme un facteur contribuant potentiellement à l'échec du traitement et envisager une autre stratégie thérapeutique. A l'inverse, une charge bactérienne faible est attendue dans certaines situations cliniques comme en pré- ou péri-opératoire où un traitement antibiotique est administré à des fins prophylactiques. Dans ce cas, des antibiotiques mis de côté, en raison de leur inefficacité ou leur toxicité liée à la nécessité d'utiliser des fortes doses en cas d'infection sévère, pourraient retrouver leur utilité. Néanmoins, des études cliniques supplémentaires sont nécessaires avant que des changements dans la pratique clinique courante puissent être effectués en toute sécurité.

Enfin, contrairement à ce qui avait été observé dans notre étude *in vitro*, aucune repousse n'a été observée lors de nos « TKC » *in vivo*, des expériences plus longues auraient peut-être été nécessaires pour visualiser ce phénomène. Dans un tel cas, des études de biologie moléculaires auraient pu permettre d'identifier les mécanismes de résistance adaptative développés par les bactéries *in vivo*. Cependant, des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont montré qu'il était difficile d'extraire et de purifier les ARN bactériens à partir de organes infectés. En effet, il existe peu de protocoles expérimentaux permettant d'étudier les signatures transcriptomiques bactériennes (ARN messagers, ARNm) en raison des faibles rendements en ARNm bactérien par rapport à ceux de l'ARNm de l'hôte (T. Y. Wong et al. 2019; Robbe-Saule et al. 2017). Ainsi, un protocole d'extraction d'ARN bactérien à partir d'organes infectés permettant d'obtenir des concentrations suffisantes en acides nucléiques est en cours de développement au laboratoire pour étudier les phénomènes de résistances *in vivo*.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de caractériser l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur l'activité de la PMB *in vitro et in vivo* à l'aide d'une analyse PKPD, ouvrant des perspectives d'études intéressantes.

ANNEXES



Annexe 1. Classification d'Amber des ß-lactamases

REFERENCES

« About | JPIAMR ». s. d. Consulté le 6 juillet 2021. https://www.jpiamr.eu/about-jpiamr/.
« About IMI ». s. d. IMI Innovative Medicines Initiative. Consulté le 6 juillet 2021. http://www.imi.europa.eu/about-imi.
Adams, Mark D., Karrie Goglin, Neil Molyneaux, Kristine M. Hujer, Heather Lavender, Jennifer J. Jamison, Ian J. MacDonald, et al. 2008. « Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii ». *Journal of Bacteriology* 190 (24): 8053-64. https://doi.org/10.1128/JB.00834-08.
Adams, Mark D., Gabrielle C. Nickel, Saralee Bajaksouzian, Heather Lavender, A. Rekha Murthy, Michael R. Jacobs, et Robert A. Bonomo. 2009. « Resistance to Colistin in Acinetobacter Baumannii Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (9): 3628-34. https://doi.org/10.1128/AAC.00284-09.
Adler, Amos, Ma'ayan Ben-Dalak, Ina Chmelnitsky, et Yehuda Carmeli. 2015. « Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in Klebsiella pneumoniae Isolates with Borderline Carbapenem Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (8): 5014-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00533-15.
Aedo, Sandra J., Mehmet A. Orman, et Mark P. Brynildsen. 2019. « Stationary Phase Persister Formation in Escherichia Coli Can Be Suppressed by Piperacillin and PBP3 Inhibition ». *BMC Microbiology* 19 (1): 140. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1506-7.
Agarwal, Bina, Raman Karthikeyan, P. Gayathri, B. RameshBabu, G. Ahmed, et M. V. Jagannadham. 2019. « Studies on the Mechanism of Multidrug Resistance of Acinetobacter Baumannii by Proteomic Analysis of the Outer Membrane Vesicles of the Bacterium ». *Journal of Proteins and Proteomics* 10 (1): 1-15. https://doi.org/10.1007/s42485-018-0001-4.
Akers, Kevin S., Chris Chaney, Alice Barsoumian, Miriam Beckius, Wendy Zera, Xin Yu, Charles Guymon, et al. 2010. « Aminoglycoside Resistance and Susceptibility Testing Errors in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus Complex ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4): 1132-38. https://doi.org/10.1128/JCM.02006-09.
Al Atrouni, Ahmad, Marie-Laure Joly-Guillou, Monzer Hamze, et Marie Kempf. 2016. « Reservoirs of Non-baumannii Acinetobacter Species ». *Frontiers in Microbiology* 7 (février). https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049.
Alkasaby, Nashwa M., et Maysaa El Sayed Zaki. 2017. « Molecular Study of Acinetobacter baumannii Isolates for Metallo-β-Lactamases and Extended-Spectrum-β-Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt ». *International Journal of Microbiology* 2017: 3925868. https://doi.org/10.1155/2017/3925868.
Anbazhagan, Deepa, Marzida Mansor, Gracie Ong Siok Yan, Mohd Yasim Md Yusof, Hamimah Hassan, et Shamala Devi Sekaran. 2012. « Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of an Autoinducer Synthase Gene among Biofilm Forming Clinical Isolates of Acinetobacter spp. » *PLoS ONE* 7 (7): e36696. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036696.
« Animaux utilisés à des fins scientifiques ». s. d. Consulté le 5 octobre 2021. https://agriculture.gouv.fr/animaux-utilises-des-fins-scientifiques.
Anstey, N. M., B. J. Currie, et K. M. Withnall. 1992. « Community-Acquired Acinetobacter Pneumonia in the Northern Territory of Australia ». *Clinical Infectious Diseases* 14 (1): 83-91. https://doi.org/10.1093/clinids/14.1.83.
Anstey, Nicholas M., Bart J. Currie, Marilyn Hassell, Didier Palmer, Brian Dwyer, et Harald Seifert. 2002. « Community-Acquired Bacteremic Acinetobacter Pneumonia in Tropical

Australia Is Caused by Diverse Strains of Acinetobacter Baumannii, with Carriage in the Throat in at-Risk Groups ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (2): 685-86. https://doi.org/10.1128/jcm.40.2.685-686.2002.

Antunes, Luísa C. S., Paolo Visca, et Kevin J. Towner. 2014. « Acinetobacter Baumannii: Evolution of a Global Pathogen ». *Pathogens and Disease* 71 (3): 292-301. https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125.

Apfeld, Javier, et Scott Alper. 2018. « What Can We Learn About Human Disease from the Nematode C. elegans? » *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1706: 53-75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_4.

Aranzana-Climent, V., J. M. Buyck, Y. Smani, J. Pachón-Diaz, S. Marchand, W. Couet, et N. Grégoire. 2020. « Semi-Mechanistic PK/PD Modelling of Combined Polymyxin B and Minocycline against a Polymyxin-Resistant Strain of Acinetobacter Baumannii ». *Clinical Microbiology and Infection* 26 (9): 1254.e9-1254.e15. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.017.

Ardebili, Abdollah, Abdolaziz Rastegar Lari, Maryam Beheshti, et Elnaz Rastegar Lari. 2015. « Association between mutations in gyrA and parC genes of Acinetobacter baumannii clinical isolates and ciprofloxacin resistance ». *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 18 (6): 623-26.

Aygün, G., O. Demirkiran, T. Utku, B. Mete, S. Ürkmez, M. Yılmaz, H. Yaşar, Y. Dikmen, et R. Öztürk. 2002. « Environmental Contamination during a Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii Outbreak in an Intensive Care Unit ». *Journal of Hospital Infection* 52 (4): 259-62. https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1300.

Azad, Mohammad A. K., Johnny X. Huang, Matthew A. Cooper, Kade D. Roberts, Philip E. Thompson, Roger L. Nation, Jian Li, et Tony Velkov. 2012. « Structure-Activity Relationships for the Binding of Polymyxins with Human α-1-Acid Glycoprotein ». *Biochemical Pharmacology* 84 (3): 278-91. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.004.

Baeder, Desiree Y., et Roland R. Regoes. 2019. « Pharmacodynamic Inoculum Effect from the Perspective of Bacterial Population Modeling ». *BioRxiv*, février, 550368. https://doi.org/10.1101/550368.

Baltch, Aldona L., William Ritz, Lawrence H. Bopp, Phyllis B. Michelsen, et Raymond P. Smith. 2011. « Time-Kill Studies with Micafungin and Voriconazole against Candida Glabrata Intracellularly in Human Monocyte-Derived Macrophages and Extracellularly in Broth ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70 (4): 468-74. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.04.008.

Barnes, D. J., S. Naraqi, et J. D. Igo. 1988. « Community-Acquired Acinetobacter Pneumonia in Adults in Papua New Guinea ». *Reviews of Infectious Diseases* 10 (3): 636-39. https://doi.org/10.1093/clinids/10.3.636.

Barnes, Melissa D., Vijay Kumar, Christopher R. Bethel, Samir H. Moussa, John O'Donnell, Joseph D. Rutter, Caryn E. Good, et al. 2019. « Targeting Multidrug-Resistant Acinetobacter spp.: Sulbactam and the Diazabicyclooctenone β-Lactamase Inhibitor ETX2514 as a Novel Therapeutic Agent ». *mBio* 10 (2): e00159-19. https://doi.org/10.1128/mBio.00159-19.

Baumann, P. 1968. « Isolation of Acinetobacter from Soil and Water ». *Journal of Bacteriology* 96 (1): 39-42.

Beceiro, Alejandro, Enrique Llobet, Jesús Aranda, José Antonio Bengoechea, Michel Doumith, Michael Hornsey, Hiran Dhanji, et al. 2011. « Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of Acinetobacter Baumannii Mediated by the

PmrAB Two-Component Regulatory System ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (7): 3370-79. https://doi.org/10.1128/AAC.00079-11.

Becker, Katja, Vincent Aranzana-Climent, Sha Cao, Anna Nilsson, Reza Shariatgorji, Klara Haldimann, Björn Platzack, et al. 2021. « Efficacy of EBL-1003 (Apramycin) against Acinetobacter Baumannii Lung Infections in Mice ». *Clinical Microbiology and Infection* 27 (9): 1315-21. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.12.004.

Bedenić, B., N. Beader, et Ž Žagar. 2001. « Effect of Inoculum Size on the Antibacterial Activity of Cefpirome and Cefepime against Klebsiella Pneumoniae Strains Producing SHV Extended-Spectrum β-Lactamases ». *Clinical Microbiology and Infection* 7 (11): 626-35. https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.x.

Bentancor, Leticia V., Jennifer M. O'Malley, Cagla Bozkurt-Guzel, Gerald B. Pier, et Tomás Maira-Litrán. 2012. « Poly-N-Acetyl-β-(1-6)-Glucosamine Is a Target for Protective Immunity against Acinetobacter baumannii Infections ». *Infection and Immunity* 80 (2): 651-56. https://doi.org/10.1128/IAI.05653-11.

Bernards, A. T., H. M. Frénay, B. T. Lim, W. D. Hendriks, L. Dijkshoorn, et C. P. van Boven. 1998. « Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Acinetobacter Baumannii: An Unexpected Difference in Epidemiologic Behavior ». *American Journal of Infection Control* 26 (6): 544-51. https://doi.org/10.1053/ic.1998.v26.a84555.

Betrosian, Alex P., Frantzeska Frantzeskaki, Anna Xanthaki, et George Georgiadis. 2007. « High-dose ampicillin-sulbactam as an alternative treatment of late-onset VAP from multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 39 (1): 38-43. https://doi.org/10.1080/00365540600951184.

Bhagunde, Pratik, Kai-Tai Chang, Renu Singh, Vandana Singh, Kevin W. Garey, Michael Nikolaou, et Vincent H. Tam. 2010. « Mathematical Modeling To Characterize the Inoculum Effect ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (11): 4739-43. https://doi.org/10.1128/AAC.01831-09.

Bhuiyan, Md Saruar, Felix Ellett, Gerald L. Murray, Xenia Kostoulias, Gustavo M. Cerqueira, Keith E. Schulze, Mohd Hafidz Mahamad Maifiah, et al. 2016. « Acinetobacter Baumannii Phenylacetic Acid Metabolism Influences Infection Outcome through a Direct Effect on Neutrophil Chemotaxis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (34): 9599-9604. https://doi.org/10.1073/pnas.1523116113.

« Biofilms bactériens et santé ». 2020. *Encyclopédie de l'environnement* (blog). 17 mars 2020. https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/.

Blackwell, Grace A., Mohammad Hamidian, et Ruth M. Hall. 2016. « IncM Plasmid R1215 Is the Source of Chromosomally Located Regions Containing Multiple Antibiotic Resistance Genes in the Globally Disseminated Acinetobacter baumannii GC1 and GC2 Clones ». *mSphere* 1 (3). https://doi.org/10.1128/mSphere.00117-16.

Blanco, P., Sara Hernando-Amado, J. A. Reales-Calderón, F. Corona, Felipe Lira, Manuel Alcalde-Rico, Alejandra Bernardini, M. B. Sánchez, et J. Martínez. 2016. « Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants ». *Microorganisms*. https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014.

Bou, G., et J. Martínez-Beltrán. 2000. « Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the Gene Encoding an AmpC Beta-Lactamase in Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (2): 428-32. https://doi.org/10.1128/aac.44.2.428-432.2000.

Bou, Germán, Gonzalo Cerveró, M. Angeles Domínguez, Carmen Quereda, et Jesús Martínez-Beltrán. 2000. « Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant Acinetobacter baumannii Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme: High-Level Carbapenem Resistance in A. baumannii Is Not Due Solely to the Presence of β-Lactamases ». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (9): 3299-3305.

Bowers, Dana R., Henry Cao, Jian Zhou, Kimberly R. Ledesma, Dongxu Sun, Olga Lomovskaya, et Vincent H. Tam. 2015. « Assessment of Minocycline and Polymyxin B Combination against Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (5): 2720-25. https://doi.org/10.1128/AAC.04110-14.

Breij, Anna de, Matthieu Eveillard, Lenie Dijkshoorn, Peterhans J. van den Broek, Peter H. Nibbering, et Marie-Laure Joly-Guillou. 2012. « Differences in Acinetobacter Baumannii Strains and Host Innate Immune Response Determine Morbidity and Mortality in Experimental Pneumonia ». *PLOS ONE* 7 (2): e30673. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030673.

Brook, I. 1989. « Inoculum Effect ». *Reviews of Infectious Diseases* 11 (3): 361-68. https://doi.org/10.1093/clinids/11.3.361.

Broussou, Diane C., Pierre-Louis Toutain, Frédérique Woehrlé, Farid El Garch, Alain Bousquet-Melou, et Aude A. Ferran. 2019. « Comparison of in Vitro Static and Dynamic Assays to Evaluate the Efficacy of an Antimicrobial Drug Combination against Staphylococcus Aureus ». *PloS One* 14 (1): e0211214. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211214.

Bulitta, Jürgen B., Neang S. Ly, Jenny C. Yang, Alan Forrest, William J. Jusko, et Brian T. Tsuji. 2009. « Development and Qualification of a Pharmacodynamic Model for the Pronounced Inoculum Effect of Ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (1): 46-56. https://doi.org/10.1128/AAC.00489-08.

Bulitta, Jürgen B., Jenny C. Yang, Liliana Yohonn, Neang S. Ly, Silvia V. Brown, Rebecca E. D'Hondt, William J. Jusko, Alan Forrest, et Brian T. Tsuji. 2010. « Attenuation of Colistin Bactericidal Activity by High Inoculum of Pseudomonas aeruginosa Characterized by a New Mechanism-Based Population Pharmacodynamic Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (5): 2051-62. https://doi.org/10.1128/AAC.00881-09.

Burgess, David S., et Ronald G. Hall. 2004. « In Vitro Killing of Parenteral Beta-Lactams against Standard and High Inocula of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Non-ESBL Producing Klebsiella Pneumoniae ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 49 (1): 41-46. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.11.007.

Cafiso, Viviana, Stefano Stracquadanio, Flavia Lo Verde, Giacoma Gabriele, Maria Lina Mezzatesta, Carla Caio, Giuseppe Pigola, Alfredo Ferro, et Stefania Stefani. 2019. « Colistin Resistant A. Baumannii: Genomic and Transcriptomic Traits Acquired Under Colistin Therapy ». *Frontiers in Microbiology* 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03195.

Cai, Yiying, Winnie Lee, et Andrea L. Kwa. 2015. « Polymyxin B versus Colistin: An Update ». *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, octobre. https://www-tandfonline-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/abs/10.1586/14787210.2015.1093933.

Cantón, Rafael, et María-Isabel Morosini. 2011. « Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics ». *FEMS Microbiology Reviews* 35 (5): 977-91. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00295.x.

Carbonne, A., T. Naas, K. Blanckaert, C. Couzigou, C. Cattoen, J. -L. Chagnon, P. Nordmann, et P. Astagneau. 2005. « Investigation of a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum

β-Lactamase VEB-1-Producing Isolates of Acinetobacter Baumannii in a Hospital Setting ». *Journal of Hospital Infection* 60 (1): 14-18. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.07.027.

Catel-Ferreira, Manuella, Rony Nehmé, Virginie Molle, Jesús Aranda, Emeline Bouffartigues, Sylvie Chevalier, Germán Bou, Thierry Jouenne, et Emmanuelle Dé. 2012. « Deciphering the Function of the Outer Membrane Protein OprD Homologue of Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (7): 3826-32. https://doi.org/10.1128/AAC.06022-11.

Celenza, Giuseppe, Cristina Pellegrini, Marisa Caccamo, Bernardetta Segatore, Gianfranco Amicosante, et Mariagrazia Perilli. 2006. « Spread of BlaCTX-M-Type and BlaPER-2 β-Lactamase Genes in Clinical Isolates from Bolivian Hospitals ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57 (5): 975-78. https://doi.org/10.1093/jac/dkl055.

Chang, Ping-Chin, Chi-Chung Chen, Ying Chen Lu, Chih-Cheng Lai, Hui-Ling Huang, Yin-Ching Chuang, et Hung-Jen Tang. 2018. « The Impact of Inoculum Size on the Activity of Cefoperazone-Sulbactam against Multidrug Resistant Organisms ». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 51 (2): 207-13. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.026.

Chapartegui-González, Itziar, María Lázaro-Díez, Zaloa Bravo, Jesús Navas, José M. Icardo, et José Ramos-Vivas. 2018. « Acinetobacter baumannii maintains its virulence after long-time starvation ». *PLoS ONE* 13 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201961.

Chauzy, A., H. Ih, M. Jacobs, S. Marchand, N. Grégoire, W. Couet, et J. M. Buyck. 2020. « Sequential Time-Kill, a Simple Experimental Trick To Discriminate between Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Models with Distinct Heterogeneous Subpopulations versus Homogenous Population with Adaptive Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (8): e00788-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00788-20.

Chauzy, Alexia, Bruna Gaelzer Silva Torres, Julien Buyck, Boudewijn de Jonge, Christophe Adier, Sandrine Marchand, William Couet, et Nicolas Grégoire. 2019. « Semimechanistic Pharmacodynamic Modeling of Aztreonam-Avibactam Combination to Understand Its Antimicrobial Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria ». *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 8 (11): 815-24. https://doi.org/10.1002/psp4.12452.

Chauzy, Alexia, Hariyanto Ih, Mathieu Jacobs, Sandrine Marchand, Nicolas Grégoire, William Couet, et Julien M. Buyck. 2020. « Sequential Time-Kill, a Simple Experimental Trick To Discriminate between Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Models with Distinct Heterogeneous Subpopulations versus Homogenous Population with Adaptive Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (8): e00788-20. https://doi.org/10.1128/AAC.00788-20.

Cheah, Soon-Ee, Matthew D. Johnson, Yan Zhu, Brian T. Tsuji, Alan Forrest, Jurgen B. Bulitta, John D. Boyce, Roger L. Nation, et Jian Li. 2016. « Polymyxin Resistance in Acinetobacter baumannii: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens ». *Scientific Reports* 6 (mai). https://doi.org/10.1038/srep26233.

Cheah, Soon-Ee, Jiping Wang, Van Thi Thu Nguyen, John D. Turnidge, Jian Li, et Roger L. Nation. 2015. « New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in mouse thigh

and lung infection models: smaller response in lung infection ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (12): 3291-97. https://doi.org/10.1093/jac/dkv267.

Chen, M. Z., P. R. Hsueh, L. N. Lee, C. J. Yu, P. C. Yang, et K. T. Luh. 2001. « Severe Community-Acquired Pneumonia Due to Acinetobacter Baumannii ». *Chest* 120 (4): 1072-77. https://doi.org/10.1378/chest.120.4.1072.

Cheong, Hae Suk, So Yeon Kim, Yu Mi Wi, Kyong Ran Peck, et Kwan Soo Ko. 2019. « Colistin Heteroresistance in Klebsiella Pneumoniae Isolates and Diverse Mutations of PmrAB and PhoPQ in Resistant Subpopulations ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (9): 1444. https://doi.org/10.3390/jcm8091444.

Choi, Chul Hee, Sung Hee Hyun, Ji Young Lee, Jun Sik Lee, Yong Seok Lee, Soon Ae Kim, Jeong-Pil Chae, Seung Min Yoo, et Je Chul Lee. 2008. « Acinetobacter Baumannii Outer Membrane Protein A Targets the Nucleus and Induces Cytotoxicity ». *Cellular Microbiology* 10 (2): 309-19. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x.

Choi, Chul Hee, Eun Young Lee, Yoo Chul Lee, Tae In Park, Hwa Jung Kim, Sung Hee Hyun, Soon Ae Kim, Seong-Kyu Lee, et Je Chul Lee. 2005. « Outer Membrane Protein 38 of Acinetobacter Baumannii Localizes to the Mitochondria and Induces Apoptosis of Epithelial Cells ». *Cellular Microbiology* 7 (8): 1127-38. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x.

Chuang, Yu-Chung, Chien-Yu Cheng, Wang-Huei Sheng, Hsin-Yun Sun, Jann-Tay Wang, Yee-Chun Chen, et Shan-Chwen Chang. 2014. « Effectiveness of Tigecycline-Based versus Colistin- Based Therapy for Treatment of Pneumonia Caused by Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii in a Critical Setting: A Matched Cohort Analysis ». *BMC Infectious Diseases* 14 (février): 102. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-102.

Chusri, Sarunyou, Virasakdi Chongsuvivatwong, Jesabel I. Rivera, Kachornsakdi Silpapojakul, Kamonnut Singkhamanan, Edward McNeil, et Yohei Doi. 2014. « Clinical Outcomes of Hospital-Acquired Infection with Acinetobacter Nosocomialis and Acinetobacter Pittii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (7): 4172-79. https://doi.org/10.1128/AAC.02992-14.

Clark, Richard B. 1996. « Imipenem Resistance among Acinetobacter Baumannii: Association with Reduced Expression of a 33–36 KDa Outer Membrane Protein ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 38 (2): 245-51. https://doi.org/10.1093/jac/38.2.245.

Collège national de pharmacologie médicale, et Société française de pharmacologie et de thérapeutique. 2018. *Pharmacologie des anti-infectieux*. Elsevier Masson. Elsevier Health Sciences.

Collinet-Adler, Stefan, Carlos A. Castro, Charles Gerald T. Ledonio, Joan E. Bechtold, et Dean T. Tsukayama. 2011. « Acinetobacter baumannii is not Associated with Osteomyelitis in a Rat Model: A Pilot Study ». *Clinical Orthopaedics and Related Research* 469 (1): 274-82. https://doi.org/10.1007/s11999-010-1488-0.

Cooper, Merlin L., et Helen M. Keller. 1942. « Factors Influencing the Choice of Media for in Vitro Sulfonamide Studies ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 50 (1): 148-52. https://doi.org/10.3181/00379727-50-13728.

Corvec, Stéphane, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Cécile Giraudeau, Henri Drugeon, et Alain Reynaud. 2003. « AmpC Cephalosporinase Hyperproduction in Acinetobacter Baumannii Clinical Strains ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (4): 629-35. https://doi.org/10.1093/jac/dkg407.

Couet, W., N. Grégoire, P. Gobin, P. J. Saulnier, D. Frasca, S. Marchand, et O. Mimoz. 2011. « Pharmacokinetics of Colistin and Colistimethate Sodium after a Single 80-Mg

Intravenous Dose of CMS in Young Healthy Volunteers ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 89 (6): 875-79. https://doi.org/10.1038/clpt.2011.48.

Craig, William A., Sujata M. Bhavnani, et Paul G. Ambrose. 2004. « The Inoculum Effect: Fact or Artifact? » *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50 (4): 229-30. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.07.006.

Crandon, Jared L., Virna J. Schuck, Mary Anne Banevicius, Marie-Eve Beaudoin, Wright W. Nichols, M. Angela Tanudra, et David P. Nicolau. 2012. « Comparative In Vitro and In Vivo Efficacies of Human Simulated Doses of Ceftazidime and Ceftazidime-Avibactam against Pseudomonas aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (12): 6137-46. https://doi.org/10.1128/AAC.00851-12.

Cross, Alan S. 2008. « What is a virulence factor? » *Critical Care* 12 (6): 196. https://doi.org/10.1186/cc7127.

Dadgostar, Porooshat. 2019. « Antimicrobial Resistance: Implications and Costs ». *Infection and Drug Resistance* 12 (décembre): 3903-10. https://doi.org/10.2147/IDR.S234610.

Daly, A. Kathleen, Bosko Postic, et Edward H. Kass. 1962. « Infections Due to Organisms of the Genus Herellea: B5W and B. Anitratum ». *Archives of Internal Medicine* 110 (5): 580-91. https://doi.org/10.1001/archinte.1962.03620230026006.

Danes, Cristina, Margarita M. Navia, Joaquim Ruiz, Francesc Marco, Angels Jurado, M. Teresa Jimenez de Anta, et Jordi Vila. 2002. « Distribution of β-Lactamases in Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates and the Effect of Syn 2190 (AmpC Inhibitor) on the MICs of Different β-Lactam Antibiotics ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50 (2): 261-64. https://doi.org/10.1093/jac/dkf092.

Das, I., P. Lambert, D. Hill, M. Noy, J. Bion, et T. Elliott. 2002. « Carbapenem-Resistant Acinetobacter and Role of Curtains in an Outbreak in Intensive Care Units ». *Journal of Hospital Infection* 50 (2): 110-14. https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1127.

« Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial Resistance ». s. d. European Centre for Disease Prevention and Control. Consulté le 21 août 2020. https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc.

Deris, Zakuan Z., Jesmin Akter, Sivashangarie Sivanesan, Kade D. Roberts, Philip E. Thompson, Roger L. Nation, Jian Li, et Tony Velkov. 2014. « A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity ». *The Journal of antibiotics* 67 (2): 147-51. https://doi.org/10.1038/ja.2013.111.

Dey, Debasish Kumar, Joonmo Park, et Sun Chul Kang. 2020. « Genotypic, Phenotypic, and Pathogenic Characterization of the Soil Isolated Acinetobacter Courvalinii ». *Microbial Pathogenesis* 149 (décembre): 104287. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104287.

« Drug detoxification dynamics explain the postantibiotic effect ». 2017. *Molecular Systems Biology* 13 (10): 948. https://doi.org/10.15252/msb.20177723.

Drusano, G. L., Robert A. Bonomo, Steven M. Marshall, Laura J. Rojas, Mark D. Adams, Maria F. Mojica, Barry N. Kreiswirth, et al. 2021. « Emergence of Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Pseudomonas aeruginosa Isolate Producing Derepressed blaPDC in a Hollow-Fiber Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65 (6): e00124-21. https://doi.org/10.1128/AAC.00124-21.

Dudhani, Rajesh V., John D. Turnidge, Roger L. Nation, et Jian Li. 2010. « fAUC/MIC is the most predictive pharmacokinetic/pharmacodynamic index of colistin against Acinetobacter

baumannii in murine thigh and lung infection models ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (9): 1984-90. https://doi.org/10.1093/jac/dkq226.

Dupont, Myrielle, Jean-Marie Pagès, Daniel Lafitte, Axel Siroy, et Claude Bollet. 2005. « Identification of an OprD Homologue in Acinetobacter Baumannii ». *Journal of Proteome Research* 4 (6): 2386-90. https://doi.org/10.1021/pr050143q.

Eagle, Harry, Ralph Fleischman, et Arlyne D. Musselman. 1950. « The bactericidal action of penicillin in vivo: the participation of the host, and the slow recovery of the surviving organisms ». *Annals of Internal Medicine* 33 (3): 544-71. https://doi.org/10.7326/0003-4819-33-3-544.

El-Saed, Aiman, Hanan H. Balkhy, Hasan M. Al-Dorzi, Raymond Khan, Asgar H. Rishu, et Yaseen M. Arabi. 2013. « Acinetobacter Is the Most Common Pathogen Associated with Late-Onset and Recurrent Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Intensive Care Unit in Saudi Arabia ». *International Journal of Infectious Diseases* 17 (9): e696-701. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.004.

Endimiani, Andrea, Francesco Luzzaro, Roberta Migliavacca, Elisabetta Mantengoli, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Laura Pagani, Robert A. Bonomo, Gian Maria Rossolini, et Antonio Toniolo. 2007. « Spread in an Italian Hospital of a Clonal Acinetobacter baumannii Strain Producing the TEM-92 Extended-Spectrum β-Lactamase ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (6): 2211-14. https://doi.org/10.1128/AAC.01139-06.

Espinal, Paula, Alix Pantel, Dora Rolo, Sara Marti, Rafael López-Rojas, Younes Smani, Jerónimo Pachón, Jordi Vila, et Jean-Philippe Lavigne. 2019. « Relationship Between Different Resistance Mechanisms and Virulence in Acinetobacter Baumannii ». *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 25 (5): 752-60. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0182.

« EUCAST: MIC determination ». s. d. Consulté le 29 juin 2021. https://eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/.

Eveillard, Matthieu, Christophe Soltner, Marie Kempf, Jean-Paul Saint-André, Carole Lemarié, Catherine Randrianarivelo, Harald Seifert, Michel Wolff, et Marie-Laure Joly-Guillou. 2010. « The Virulence Variability of Different Acinetobacter Baumannii Strains in Experimental Pneumonia ». *The Journal of Infection* 60 (2): 154-61. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.09.004.

Fagon, J. Y., J. Chastre, Y. Domart, J. L. Trouillet, et C. Gibert. 1996. « Mortality Due to Ventilator-Associated Pneumonia or Colonization with Pseudomonas or Acinetobacter Species: Assessment by Quantitative Culture of Samples Obtained by a Protected Specimen Brush ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 23 (3): 538-42. https://doi.org/10.1093/clinids/23.3.538.

Falagas, Matthew E., Margarita Kyriakidou, Georgios L. Voulgaris, Filippos Vokos, Sevasti Politi, et Konstantinos S. Kechagias. 2021. « Clinical Use of Intravenous Polymyxin B for the Treatment of Patients with Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: An Evaluation of the Current Evidence ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 24 (mars): 342-59. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.026.

Fallah, Fatemeh, Maryam Noori, Ali Hashemi, Hossein Goudarzi, Abdollah Karimi, Soroor Erfanimanesh, et Shadi Alimehr. 2014. « Prevalence of bla NDM, bla PER, bla VEB, bla IMP, and bla VIM Genes among Acinetobacter baumannii Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran ». *Scientifica* 2014: 245162. https://doi.org/10.1155/2014/245162.

Fan, Bing, Jie Guan, Xiumei Wang, et Yulong Cong. 2016. « Activity of Colistin in Combination with Meropenem, Tigecycline, Fosfomycin, Fusidic Acid, Rifampin or Sulbactam against

Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii in a Murine Thigh-Infection Model ». *PloS One* 11 (6): e0157757. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157757.

Fantin, B., J. Poujade, N. Grégoire, F. Chau, A. Roujansky, N. Kieffer, M. Berleur, W. Couet, et P. Nordmann. 2019. « The Inoculum Effect of Escherichia Coli Expressing Mcr-1 or Not on Colistin Activity in a Murine Model of Peritonitis ». *Clinical Microbiology and Infection* 25 (12): 1563.e5-1563.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.08.021.

Fernández-Cuenca, Felipe, Luis Martínez-Martínez, Mª Carmen Conejo, Juan A. Ayala, Evelio J. Perea, et Alvaro Pascual. 2003. « Relationship between β-Lactamase Production, Outer Membrane Protein and Penicillin-Binding Protein Profiles on the Activity of Carbapenems against Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (3): 565-74. https://doi.org/10.1093/jac/dkg097.

Ferran, Aude A., Anne-Sylvie Kesteman, Pierre-Louis Toutain, et Alain Bousquet-Mélou. 2009. « Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of the Influence of Inoculum Size on the Selection of Resistance in Escherichia Coli by a Quinolone in a Mouse Thigh Bacterial Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3384-90. https://doi.org/10.1128/AAC.01347-08.

Fily, Fabien, Jean-Baptiste Ronat, Nada Malou, Rupa Kanapathipillai, Caroline Seguin, Nagham Hussein, Rasheed M. Fakhri, et Céline Langendorf. 2019. « Post-traumatic osteomyelitis in Middle East war-wounded civilians: resistance to first-line antibiotics in selected bacteria over the decade 2006–2016 ». *BMC Infectious Diseases* 19 (janvier). https://doi.org/10.1186/s12879-019-3741-9.

Flamm, Robert K., Mariana Castanheira, Jennifer M. Streit, et Ronald N. Jones. 2016. « Minocycline Activity Tested against Acinetobacter Baumannii Complex, Stenotrophomonas Maltophilia, and Burkholderia Cepacia Species Complex Isolates from a Global Surveillance Program (2013) ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 85 (3): 352-55. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.019.

Founou, Raspail Carrel, Luria Leslie Founou, et Sabiha Yusuf Essack. 2017. « Clinical and Economic Impact of Antibiotic Resistance in Developing Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *PloS One* 12 (12): e0189621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621.

Fournier, Pierre Edouard, Hervé Richet, et Robert A. Weinstein. 2006. « The Epidemiology and Control of Acinetobacter Baumannii in Health Care Facilities ». *Clinical Infectious Diseases* 42 (5): 692-99. https://doi.org/10.1086/500202.

Gaddy, Jennifer A., Andrew P. Tomaras, et Luis A. Actis. 2009. « The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells ». *Infection and Immunity* 77 (8): 3150-60. https://doi.org/10.1128/IAI.00096-09.

Garnacho, Jose, Jordi Sole-Violan, Marcio Sa-Borges, Emili Diaz, et Jordi Rello. 2003. « Clinical Impact of Pneumonia Caused by Acinetobacter Baumannii in Intubated Patients: A Matched Cohort Study* ». *Critical Care Medicine* 31 (10): 2478-82. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000089936.09573.F3.

Garnacho-Montero, José, et Jean-François Timsit. 2019. « Managing Acinetobacter Baumannii Infections ». *Current Opinion in Infectious Diseases* 32 (1): 69-76. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000518.

Garonzik, S. M., J. Li, V. Thamlikitkul, D. L. Paterson, S. Shoham, J. Jacob, F. P. Silveira, A. Forrest, et R. L. Nation. 2011. « Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Formed Colistin in Critically Ill Patients from a Multicenter

Study Provide Dosing Suggestions for Various Categories of Patients ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (7): 3284-94. https://doi.org/10.1128/AAC.01733-10.

Geisinger, Edward, et Ralph R. Isberg. 2015. « Antibiotic Modulation of Capsular Exopolysaccharide and Virulence in Acinetobacter baumannii ». *PLoS Pathogens* 11 (2). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004691.

Genteluci, Gabrielle Limeira, Paula Araujo de Souza, Daniela Betzler Cardoso Gomes, Verônica Santos Sousa, Maria José de Souza, José Roberto Lannes Abib, Eduardo Almeida Ribeiro de Castro, Karyne Rangel, et Maria Helena Simões Villas Bôas. 2020. « Polymyxin B Heteroresistance and Adaptive Resistance in Multidrug- and Extremely Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii ». *Current Microbiology* 77 (9): 2300-2306. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02064-6.

« Geographical Distribution of Antimicrobial Consumption ». s. d. European Centre for Disease Prevention and Control. Consulté le 23 septembre 2021. https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/database/geographical-distribution.

Gerber, A. U., W. A. Craig, H. P. Brugger, C. Feller, A. P. Vastola, et J. Brandel. 1983. « Impact of Dosing Intervals on Activity of Gentamicin and Ticarcillin against Pseudomonas Aeruginosa in Granulocytopenic Mice ». *The Journal of Infectious Diseases* 147 (5): 910-17. https://doi.org/10.1093/infdis/147.5.910.

Gerber, Andreas U., A. Paul Vastola, John Brandel, et William A. Craig. 1982. « Selection of Aminoglycoside-Resistant Variants of Pseudomonas aeruginosa in an in Vivo Model ». *The Journal of Infectious Diseases* 146 (5): 691-97. https://doi.org/10.1093/infdis/146.5.691.

Gil-Perotin, Sara, Paula Ramirez, Veronica Marti, Jose Miguel Sahuquillo, Eva Gonzalez, Isabel Calleja, Rosario Menendez, et Juan Bonastre. 2012. « Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept ». *Critical Care* 16 (3): R93. https://doi.org/10.1186/cc11357.

Glew, R. H., R. C. Moellering, et L. J. Kunz. 1977. « Infections with Acinetobacter Calcoaceticus (Herellea Vaginicola): Clinical and Laboratory Studies ». *Medicine* 56 (2): 79-97. https://doi.org/10.1097/00005792-197703000-00001.

González, R. H., L. Dijkshoorn, M. Van den Barselaar, et C. Nudel. 2009. « Quorum Sensing Signal Profile of Acinetobacter Strains from Nosocomial and Environmental Sources ». *Revista Argentina De Microbiologia* 41 (2): 73-78.

González, R. H., A. Nusblat, et B. C. Nudel. 2001. « Detection and Characterization of Quorum Sensing Signal Molecules in Acinetobacter Strains ». *Microbiological Research* 155 (4): 271-77. https://doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80004-5.

Gribun, Anna, Yeshayahu Nitzan, Izabella Pechatnikov, Gitit Hershkovits, et Don J Katcoff. 2003a. « Molecular and Structural Characterization of the HMP-AB Gene Encoding a Pore-Forming Protein from a Clinical Isolate Of » 47: 10.

Gribun, Anna, Yeshayahu Nitzan, Izabella Pechatnikov, Gitit Hershkovits, et Don J. Katcoff. 2003b. « Molecular and Structural Characterization of the HMP-AB Gene Encoding a Pore-Forming Protein from a Clinical Isolate of Acinetobacter Baumannii ». *Current Microbiology* 47 (5): 434-43. https://doi.org/10.1007/s00284-003-4050-4.

Harada, Y., Y. Morinaga, N. Kaku, S. Nakamura, N. Uno, H. Hasegawa, K. Izumikawa, S. Kohno, et K. Yanagihara. 2014. « In Vitro and in Vivo Activities of Piperacillin-Tazobactam and Meropenem at Different Inoculum Sizes of ESBL-Producing Klebsiella Pneumoniae ».

Clinical Microbiology and Infection 20 (11): O831-39. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12677.

Harris, Greg, Bruce E. Holbein, Hongyan Zhou, H. Howard Xu, et Wangxue Chen. 2019. « Potential Mechanisms of Mucin-Enhanced Acinetobacter Baumannii Virulence in the Mouse Model of Intraperitoneal Infection ». *Infection and Immunity* 87 (11): e00591-19. https://doi.org/10.1128/IAI.00591-19.

Harris, Greg, Rhonda Kuo Lee, Christopher K. Lam, Gregory Kanzaki, Girishchandra B. Patel, H. Howard Xu, et Wangxue Chen. 2013. « A Mouse Model of Acinetobacter baumannii-Associated Pneumonia Using a Clinically Isolated Hypervirulent Strain ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (8): 3601-13. https://doi.org/10.1128/AAC.00944-13.

Harris, P. N. A., et J. K. Ferguson. 2012. « Antibiotic Therapy for Inducible AmpC β-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli: What Are the Alternatives to Carbapenems, Quinolones and Aminoglycosides? » *International Journal of Antimicrobial Agents* 40 (4): 297-305. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.004.

Hassan, Karl A., Qi Liu, Liam D. H. Elbourne, Irshad Ahmad, David Sharples, Varsha Naidu, Chak Lam Chan, et al. 2018. « Pacing across the Membrane: The Novel PACE Family of Efflux Pumps Is Widespread in Gram-Negative Pathogens ». *Research in Microbiology*, Special issue on Bacterial multidrug efflux pumps, 169 (7): 450-54. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.01.001.

Héritier, C., L. Poirel, et P. Nordmann. 2006. « Cephalosporinase Over-Expression Resulting from Insertion of ISAba1 in Acinetobacter Baumannii ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12 (2): 123-30. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x.

Hermes, Djuli M., Caroline Pormann Pitt, Larissa Lutz, Aline B. Teixeira, Vanessa B. Ribeiro, Bárbara Netto, Andreza F. Martins, Alexandre P. Zavascki, et Afonso L. Barth. 2013. « Evaluation of Heteroresistance to Polymyxin B among Carbapenem-Susceptible and -Resistant Pseudomonas Aeruginosa ». *Journal of Medical Microbiology* 62 (Pt 8): 1184-89. https://doi.org/10.1099/jmm.0.059220-0.

Hernandez, Rafael J., Elze Hesse, Andrea J. Dowling, Nicola M. Coyle, Edward J. Feil, Will H. Gaze, et Michiel Vos. 2019. « Using the wax moth larva Galleria mellonella infection model to detect emerging bacterial pathogens ». *PeerJ* 6 (janvier): e6150. https://doi.org/10.7717/peerj.6150.

Holden, Matt, Simon Swift, et Paul Williams. 2000. « New Signal Molecules on the Quorum-Sensing Block ». *Trends in Microbiology* 8 (3): 101-3. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01718-2.

Howard, Aoife, Michael O'Donoghue, Audrey Feeney, et Roy D. Sleator. 2012. « Acinetobacter baumannii ». *Virulence* 3 (3): 243-50. https://doi.org/10.4161/viru.19700.

Hu, Lihua, Yue Shi, Qingye Xu, Linghong Zhang, Jintao He, Yan Jiang, Lilin Liu, et al. 2020. « Capsule Thickness, Not Biofilm Formation, Gives Rise to Mucoid Acinetobacter baumannii Phenotypes That are More Prevalent in Long-Term Infections: A Study of Clinical Isolates from a Hospital in China ». *Infection and Drug Resistance* 13 (janvier): 99-109. https://doi.org/10.2147/IDR.S230178.

Huang, Johnny X., Mark A. T. Blaskovich, Ruby Pelingon, Soumya Ramu, Angela Kavanagh, Alysha G. Elliott, Mark S. Butler, A. Bruce Montgomery, et Matthew A. Cooper. 2015. « Mucin Binding Reduces Colistin Antimicrobial Activity ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10): 5925-31. https://doi.org/10.1128/AAC.00808-15.

Huang, Zhi-mi, Pei-hua Mao, Yu Chen, Lei Wu, et Jing Wu. 2004. « [Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant acinetobacter baumannii] ». *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi = Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 25 (5): 425-27.

Hujer, Kristine M., Nashaat S. Hamza, Andrea M. Hujer, Federico Perez, Marion S. Helfand, Christopher R. Bethel, Jodi M. Thomson, et al. 2005. « Identification of a New Allelic Variant of the Acinetobacter baumannii Cephalosporinase, ADC-7 β-Lactamase: Defining a Unique Family of Class C Enzymes ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2941-48. https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2941-2948.2005.

« IMI Accelerator. COMBINE Project. Availble on Https://Amr-Accelerator.Eu/about-Us/ ». s. d. IMI AMR Accelerator. Consulté le 22 juillet 2021. https://amr-accelerator.eu/about-us/.

Irie, Y., et M. R. Parsek. 2008. « Quorum Sensing and Microbial Biofilms ». In *Bacterial Biofilms*, édité par Tony Romeo, 67-84. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4.

Jones, Ronald N., Mirela Flonta, Nazahat Gurler, Mario Cepparulo, Rodrigo E. Mendes, et Mariana Castanheira. 2014. « Resistance Surveillance Program Report for Selected European Nations (2011) ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 78 (4): 429-36. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.008.

Jun, So Hyun, Jung Hwa Lee, Bo Ra Kim, Seung Il Kim, Tae In Park, Je Chul Lee, et Yoo Chul Lee. 2013. « Acinetobacter baumannii Outer Membrane Vesicles Elicit a Potent Innate Immune Response via Membrane Proteins ». *PLoS ONE* 8 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071751.

Kang, Anthony D., Kenneth P. Smith, Anders H. Berg, Katherine A. Truelson, George M. Eliopoulos, Christopher McCoy, et James E. Kirby. 2018. « Efficacy of Apramycin against Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii in the Murine Neutropenic Thigh Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (4). https://doi.org/10.1128/AAC.02585-17.

Kang, Cheol-In, Hyunjoo Pai, Sung-Han Kim, Hong-Bin Kim, Eui-Chong Kim, Myoung-don Oh, et Kang-Won Choe. 2004. « Cefepime and the inoculum effect in tests with Klebsiella pneumoniae producing plasmid-mediated AmpC-type β-lactamase ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (6): 1130-33. https://doi.org/10.1093/jac/dkh462.

Karakuzu, Ziyaettin, Remzi Iscimen, Halis Akalin, Nermin Kelebek Girgin, Ferda Kahveci, et Melda Sinirtas. 2018. « Prognostic Risk Factors in Ventilator-Associated Pneumonia ». *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 24 (mars): 1321-28. https://doi.org/10.12659/MSM.905919.

Keil, S., et B. Wiedemann. 1995. « Mathematical Corrections for Bacterial Loss in Pharmacodynamic in Vitro Dilution Models ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (5): 1054-58. https://doi.org/10.1128/AAC.39.5.1054.

Kesteman, Anne-Sylvie, Aude A. Ferran, Agnès Perrin-Guyomard, Michel Laurentie, Pascal Sanders, Pierre-Louis Toutain, et Alain Bousquet-Mélou. 2009. « Influence of Inoculum Size and Marbofloxacin Plasma Exposure on the Amplification of Resistant Subpopulations of Klebsiella Pneumoniae in a Rat Lung Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (11): 4740-48. https://doi.org/10.1128/AAC.00608-09.

Kim, Taeeun, Seung Cheol Lee, Moonsuk Bae, Heungsup Sung, Mi-Na Kim, Jiwon Jung, Min Jae Kim, et al. 2020. « In Vitro Activities and Inoculum Effects of Ceftazidime-Avibactam

and Aztreonam-Avibactam against Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates from South Korea ». *Antibiotics* 9 (12): 912. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120912.

Koenig, Steven M., et Jonathon D. Truwit. 2006. « Ventilator-Associated Pneumonia: Diagnosis, Treatment, and Prevention ». *Clinical Microbiology Reviews* 19 (4): 637-57. https://doi.org/10.1128/CMR.00051-05.

Ku, Nam Su, Su-Hyung Lee, Young- soun Lim, Heun Choi, Jin Young Ahn, Su Jin Jeong, Sung Jae Shin, et al. 2019. « In vivo efficacy of combination of colistin with fosfomycin or minocycline in a mouse model of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii pneumonia ». *Scientific Reports* 9 (novembre): 17127. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53714-0.

Kwa, Andrea, Sofia K Kasiakou, Vincent H Tam, et Matthew E Falagas. 2007. « Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E) ». *Expert Review of Anti-infective Therapy* 5 (5): 811-21. https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.811.

Kwa, Andrea L. H., Tze-Peng Lim, Jenny G. H. Low, JingGuo Hou, Asok Kurup, Randall A. Prince, et Vincent H. Tam. 2008. « Pharmacokinetics of Polymyxin B1 in Patients with Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60 (2): 163-67. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.08.008.

Kwon, Hyo Il, Shukho Kim, Man Hwan Oh, Seok Hyeon Na, Yoo Jeong Kim, Young Ho Jeon, et Je Chul Lee. 2017. « Outer membrane protein A contributes to antimicrobial resistance of Acinetobacter baumannii through the OmpA-like domain ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (11): 3012-15. https://doi.org/10.1093/jac/dkx257.

Lallemand, Elodie Anne, Claudine Zemirline, Pierre-Louis Toutain, Alain Bousquet-Melou, Aude A. Ferran, et Séverine Boullier. 2021. « Dynamic Interactions between Cephalexin and Macrophages on Different Staphylococcus Aureus Inoculum Sizes: A Tripartite in Vitro Model ». *BMC Veterinary Research* 17 (1): 23. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02746-8.

Landersdorfer, Cornelia B, Jiping Wang, Veronika Wirth, Ke Chen, Keith S Kaye, Brian T Tsuji, Jian Li, et Roger L Nation. 2018. « Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Systemically Administered Polymyxin B against Klebsiella Pneumoniae in Mouse Thigh and Lung Infection Models ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (2): 462-68. https://doi.org/10.1093/jac/dkx409.

Leal, Nilma C., Túlio L. Campos, Antonio M. Rezende, Cássia Docena, Carina L. Mendes-Marques, Felipe L. de Sá Cavalcanti, Gabriel L. Wallau, et al. 2020. « Comparative Genomics of Acinetobacter baumannii Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes ». *Frontiers in Microbiology* 11 (juin): 1176. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01176.

Lee, Chang-Ro, Jung Hun Lee, Moonhee Park, Kwang Seung Park, Il Kwon Bae, Young Bae Kim, Chang-Jun Cha, Byeong Chul Jeong, et Sang Hee Lee. 2017. « Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (mars): 55. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055.

Lee, Dong-Gun, Yoichi Murakami, David R. Andes, et William A. Craig. 2013. « Inoculum Effects of Ceftobiprole, Daptomycin, Linezolid, and Vancomycin with Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae at Inocula of 105 and 107 CFU Injected into Opposite

Thighs of Neutropenic Mice ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (3): 1434-41. https://doi.org/10.1128/AAC.00362-12.

Lee, S., K.-H. Song, S.-I. Jung, W. B. Park, S. H. Lee, Y.-S. Kim, Y. G. Kwak, et al. 2018. « Comparative Outcomes of Cefazolin versus Nafcillin for Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus Bacteraemia: A Prospective Multicentre Cohort Study in Korea ». *Clinical Microbiology and Infection* 24 (2): 152-58. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.001.

Lesho, Emil, Eun-Jeong Yoon, Patrick McGann, Erik Snesrud, Yoon Kwak, Michael Milillo, Fatma Onmus-Leone, et al. 2013. « Emergence of Colistin-Resistance in Extremely Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Containing a Novel pmrCAB Operon During Colistin Therapy of Wound Infections ». *The Journal of Infectious Diseases* 208 (7): 1142-51. https://doi.org/10.1093/infdis/jit293.

Leung, Wah-Shing, Chung-Ming Chu, Kay-Yang Tsang, Fu-Hang Lo, King-Fan Lo, et Pak-Leung Ho. 2006. « Fulminant Community-Acquired Acinetobacter Baumannii Pneumonia as a Distinct Clinical Syndrome ». *Chest* 129 (1): 102-9. https://doi.org/10.1378/chest.129.1.102.

Lhermie, Guillaume, Farid El Garch, Pierre-Louis Toutain, Aude A. Ferran, et Alain Bousquet-Mélou. 2015. « Bacterial Species-Specific Activity of a Fluoroquinolone against Two Closely Related Pasteurellaceae with Similar MICs: Differential In Vitro Inoculum Effects and In Vivo Efficacies ». *PloS One* 10 (10): e0141441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141441.

Li, Jian, Roger L. Nation, et Keith Kaye, éd. 2019. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0.

Li, R. C., et H. H. M. Ma. 1998. « Parameterization of Inoculum Effect Via Mathematical Modeling: Aminoglycosides Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli ». *Journal of Chemotherapy* 10 (3): 203-7. https://doi.org/10.1179/joc.1998.10.3.203.

Lima, Marlucy Rodrigues, Gabriella Freitas Ferreira, Wallace Ribeiro Nunes Neto, Joveliane de Melo Monteiro, Áquila Rodrigues Costa Santos, Priscila Batista Tavares, Ângelo Márcio Leite Denadai, et al. 2019. « Evaluation of the interaction between polymyxin B and Pseudomonas aeruginosa biofilm and planktonic cells: reactive oxygen species induction and zeta potential ». *BMC Microbiology* 19 (mai): 115. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1485-8.

Lin, Jie, Chunquan Xu, Renchi Fang, Jianming Cao, Xiucai Zhang, Yajie Zhao, Guofeng Dong, Yao Sun, et Tieli Zhou. 2019. « Resistance and Heteroresistance to Colistin in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Wenzhou, China ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (10): e00556-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00556-19.

Lin, Lin, Brandon Tan, Paul Pantapalangkoor, Tiffany Ho, Beverlie Baquir, Andrew Tomaras, Justin I. Montgomery, et al. 2012. « Inhibition of LpxC Protects Mice from Resistant Acinetobacter baumannii by Modulating Inflammation and Enhancing Phagocytosis ». *mBio* 3 (5): e00312-12. https://doi.org/10.1128/mBio.00312-12.

Lin, Yu-Wei, Qi Tony Zhou, Mei-Ling Han, Ke Chen, Nikolas J. Onufrak, Jiping Wang, John D. Turnidge, et al. 2018. « Elucidating the Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Aerosolized Colistin against Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii and Klebsiella Pneumoniae in a Mouse Lung Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (2). https://doi.org/10.1128/AAC.01790-17.

Liu, Yen-Hung, Shu-Chen Kuo, Yi-Tzu Lee, Ian C. Y. Chang, Su-Pen Yang, Te-Li Chen, et Chang-Phone Fung. 2012. « Amino Acid Substitutions of Quinolone Resistance Determining Regions in GyrA and ParC Associated with Quinolone Resistance in Acinetobacter Baumannii and Acinetobacter Genomic Species 13TU ». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 45 (2): 108-12. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.09.001.

LIU, YONGRUI, et XIANGQUN LIU. 2015. « Detection of AmpC β-lactamases in Acinetobacter baumannii in the Xuzhou region and analysis of drug resistance ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 10 (3): 933-36. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2612.

Lomaestro, Ben M., et G. L. Drusano. 2005. « Pharmacodynamic Evaluation of Extending the Administration Time of Meropenem using a Monte Carlo Simulation ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1): 461-63. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.461-463.2005.

« L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques ». 2018. World Health Organization. 6 juin 2018. http://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.

López-Cerero, L., E. Picón, C. Morillo, J. R. Hernández, F. Docobo, J. Pachón, J. Rodríguez-Bañ, et A. Pascual. 2010. « Comparative Assessment of Inoculum Effects on the Antimicrobial Activity of Amoxycillin-Clavulanate and Piperacillin-Tazobactam with Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing and Extended-Spectrum β-Lactamase-Non-Producing Escherichia Coli Isolates. » *Clinical Microbiology and Infection* 16 (2): 132-36. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02893.x.

López-Rojas, Rafael, Manuel Enrique Jiménez-Mejías, José Antonio Lepe, et Jerónimo Pachón. 2011. « Acinetobacter baumannii Resistant to Colistin Alters Its Antibiotic Resistance Profile: A Case Report From Spain ». *The Journal of Infectious Diseases* 204 (7): 1147-48. https://doi.org/10.1093/infdis/jir476.

Louie, Arnold, Brian D. VanScoy, Henry S. Heine, Weiguo Liu, Terry Abshire, Kari Holman, Robert Kulawy, David L. Brown, et George L. Drusano. 2012. « Differential Effects of Linezolid and Ciprofloxacin on Toxin Production by Bacillus anthracis in an In Vitro Pharmacodynamic System ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 513-17. https://doi.org/10.1128/AAC.05724-11.

Löwdin, E., I. Odenholt, S. Bengtsson, et O. Cars. 1996. « Pharmacodynamic Effects of Sub-MICs of Benzylpenicillin against Streptococcus Pyogenes in a Newly Developed in Vitro Kinetic Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (11): 2478-82. https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2478.

Luo, Guanpingsheng, Brad Spellberg, Teclegiorgis Gebremariam, Michael Bolaris, Hongkyu Lee, Yue Fu, Samuel W. French, et Ashraf S. Ibrahim. 2012. « Diabetic murine models for Acinetobacter baumannii infection ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (6): 1439-45. https://doi.org/10.1093/jac/dks050.

Luria, S. E. 1946. « A Test for Penicillin Sensitivity and Resistance in Staphylococcus ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 61 (janvier): 46-51. https://doi.org/10.3181/00379727-61-15222.

« M07: Dilution AST for Aerobically Grown Bacteria - CLSI ». s. d. Clinical & Laboratory Standards Institute. Consulté le 28 mars 2021. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/.

Ma, Xiao-Lin, Yong-Zhong Guo, Yan-Min Wu, Wei-Tao Gong, Jie Sun, et Zhen Huang. 2020. « In Vivo Bactericidal Effect of Colistin-Linezolid Combination in a Murine Model of MDR and XDR Acinetobacter Baumannii Pneumonia ». *Scientific Reports* 10 (1): 17518. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74503-0.

MacVane, Shawn H., Jared L. Crandon, et David P. Nicolau. 2014. « Characterizing In Vivo Pharmacodynamics of Carbapenems against Acinetobacter baumannii in a Murine Thigh Infection Model To Support Breakpoint Determinations ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (1): 599-601. https://doi.org/10.1128/AAC.02029-13.

Maegele, Marc, Sven Gregor, Eva Steinhausen, Bertil Bouillon, Markus M. Heiss, Walter Perbix, Frank Wappler, et al. 2005. « The Long-Distance Tertiary Air Transfer and Care of Tsunami Victims: Injury Pattern and Microbiological and Psychological Aspects* ». *Critical Care Medicine* 33 (5): 1136-40. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000163269.42524.50.

Maglio, Dana, Mary Anne Banevicius, Christina Sutherland, Chinedum Babalola, Charles H. Nightingale, et David P. Nicolau. 2005. « Pharmacodynamic Profile of Ertapenem against Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in a Murine Thigh Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1): 276-80. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.276-280.2005.

Maglio, Dana, Christine Ong, Mary Anne Banevicius, Qiuming Geng, Charles H. Nightingale, et David P. Nicolau. 2004. « Determination of the in Vivo Pharmacodynamic Profile of Cefepime against Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia Coli at Various Inocula ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (6): 1941-47. https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.1941-1947.2004.

Magnet, Sophie, Patrice Courvalin, et Thierry Lambert. 2001. « Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in Acinetobacter baumannii Strain BM4454 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (12): 3375-80. https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001.

Mannix-Fisher, Eden, et Samantha McLean. 2021. « The Antimicrobial Activity of Silver Acetate against Acinetobacter Baumannii in a Galleria Mellonella Infection Model ». *PeerJ* 9 (avril): e11196. https://doi.org/10.7717/peerj.11196.

Marra, Andrea. 2012. « A Review of Animal Models Used for Antibiotic Evaluation ». In *Antibiotic Discovery and Development*, édité par Thomas J. Dougherty et Michael J. Pucci, 1009-33. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_33.

Marum, Darcy, Laurens Manning, et Edward Raby. 2021. « Revisiting the Inoculum Effect for Streptococcus Pyogenes with a Hollow Fibre Infection Model ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, mai. https://doi.org/10.1007/s10096-021-04262-x.

Maseda, Hideaki, Isao Sawada, Kohjiro Saito, Hiroo Uchiyama, Taiji Nakae, et Nobuhiko Nomura. 2004. « Enhancement of the MexAB-OprM Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the MexEF-OprN Efflux Pump Operon in Pseudomonas Aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (4): 1320-28. https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1320-1328.2004.

McConnell, Michael J., Luis Actis, et Jerónimo Pachón. 2013. « Acinetobacter Baumannii: Human Infections, Factors Contributing to Pathogenesis and Animal Models ». *FEMS Microbiology Reviews* 37 (2): 130-55. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x.

Meagher, Alison K., Paul G. Ambrose, Thaddeus H. Grasela, et Evelyn J. Ellis-Grosse. 2005. « Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile for Tigecycline—a New Glycylcycline Antimicrobial Agent ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 52 (3): 165-71. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.05.006.

Mehta, Shachi, Vincent Aranzana-Climent, Blandine Rammaert, Nicolas Grégoire, Sandrine Marchand, William Couet, et Julien M. Buyck. 2019. « Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data To Support Cefoxitin Nebulization for the Treatment of Mycobacterium Abscessus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (7): e02651-18. https://doi.org/10.1128/AAC.02651-18.

Miller, William R, Carlos Seas, Lina P Carvajal, Lorena Diaz, Aura M Echeverri, Carolina Ferro, Rafael Rios, et al. 2018. « The Cefazolin Inoculum Effect Is Associated With Increased Mortality in Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bacteremia ». *Open Forum Infectious Diseases* 5 (6): ofy123. https://doi.org/10.1093/ofid/ofy123.

Mizunaga, Shingo, Tomoko Kamiyama, Yoshiko Fukuda, Masahiro Takahata, et Junichi Mitsuyama. 2005. « Influence of inoculum size of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (1): 91-96. https://doi.org/10.1093/jac/dki163.

Moffatt, Jennifer H., Marina Harper, Ben Adler, Roger L. Nation, Jian Li, et John D. Boyce. 2011. « Insertion Sequence ISAba11 Is Involved in Colistin Resistance and Loss of Lipopolysaccharide in Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (6): 3022-24. https://doi.org/10.1128/AAC.01732-10.

Moffatt, Jennifer H., Marina Harper, Paul Harrison, John D. F. Hale, Evgeny Vinogradov, Torsten Seemann, Rebekah Henry, et al. 2010. « Colistin Resistance in Acinetobacter Baumannii Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (12): 4971-77. https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10.

Moffatt, Jennifer H., Marina Harper, Ashley Mansell, Bethany Crane, Timothy C. Fitzsimons, Roger L. Nation, Jian Li, Ben Adler, et John D. Boyce. 2013. « Lipopolysaccharide-Deficient Acinetobacter baumannii Shows Altered Signaling through Host Toll-Like Receptors and Increased Susceptibility to the Host Antimicrobial Peptide LL-37 ». *Infection and Immunity* 81 (3): 684-89. https://doi.org/10.1128/IAI.01362-12.

Monogue, Marguerite L., George Sakoulas, Victor Nizet, et David P. Nicolau. 2018. « Humanized Exposures of a β-Lactam-β-Lactamase Inhibitor, Tazobactam, versus Non-β-Lactam-β-Lactamase Inhibitor, Avibactam, with or without Colistin, against Acinetobacter Baumannii in Murine Thigh and Lung Infection Models ». *Pharmacology* 101 (5-6): 255-61. https://doi.org/10.1159/000486445.

Morris, Faye C., Carina Dexter, Xenia Kostoulias, Muhammad Ikhtear Uddin, et Anton Y. Peleg. 2019. « The Mechanisms of Disease Caused by Acinetobacter Baumannii ». *Frontiers in Microbiology* 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601.

Mouton, Johan W. 2018. « Soup with or without Meatballs: Impact of Nutritional Factors on the MIC, Kill-Rates and Growth-Rates ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 125 (décembre): 23-27. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.008.

Naas, Thierry, Pierre Bogaerts, Caroline Bauraing, Yves Degheldre, Youri Glupczynski, et Patrice Nordmann. 2006. « Emergence of PER and VEB Extended-Spectrum β-Lactamases in Acinetobacter Baumannii in Belgium ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (1): 178-82. https://doi.org/10.1093/jac/dkl178.

Naas, Thierry, Patrice Nordmann, et Annie Heidt. 2007. « Intercountry Transfer of PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Acinetobacter Baumannii from Romania ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 (2): 226-28. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.08.032.

Nagano, Noriyuki, Yukiko Nagano, Christophe Cordevant, Naohiro Shibata, et Yoshichika Arakawa. 2004. « Nosocomial Transmission of CTX-M-2 β-Lactamase-Producing Acinetobacter baumannii in a Neurosurgery Ward ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (9): 3978-84. https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.3978-3984.2004.

Naiemi, Nashwan Al, Birgitta Duim, Paul H. M. Savelkoul, Lodewijk Spanjaard, Evert de Jonge, Aldert Bart, Christina M. Vandenbroucke-Grauls, et Menno D. de Jong. 2005. « Widespread Transfer of Resistance Genes between Bacterial Species in an Intensive Care Unit: Implications for Hospital Epidemiology ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4862-64. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4862-4864.2005.

Nakamura, Rio, Tsukasa Ito-Horiyama, Miki Takemura, Shinsuke Toba, Shuhei Matsumoto, Tatsuya Ikehara, Masakatsu Tsuji, Takafumi Sato, et Yoshinori Yamano. 2019. « In Vivo Pharmacodynamic Study of Cefiderocol, a Novel Parenteral Siderophore Cephalosporin, in Murine Thigh and Lung Infection Models ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (9): e02031-18. https://doi.org/10.1128/AAC.02031-18.

Nielsen, Elisabet I., et Lena E. Friberg. 2013. « Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Antibacterial Drugs ». *Pharmacological Reviews* 65 (3): 1053-90. https://doi.org/10.1124/pr.111.005769.

Nielsen, Elisabet I, David D Khan, Sha Cao, Ulrika Lustig, Diarmaid Hughes, Dan I Andersson, et Lena E Friberg. 2017. « Can a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PKPD) model be predictive across bacterial densities and strains? External evaluation of a PKPD model describing longitudinal in vitro data ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (11): 3108-16. https://doi.org/10.1093/jac/dkx269.

Nielsen, Signe M., Niels Nørskov-Lauritsen, Thomas Bjarnsholt, et Rikke L. Meyer. 2016. « Achromobacter Species Isolated from Cystic Fibrosis Patients Reveal Distinctly Different Biofilm Morphotypes ». *Microorganisms* 4 (3). https://doi.org/10.3390/microorganisms4030033.

Nitzan, Yeshayahu, Einat Bokobza Deutsch, et Izabella Pechatnikov. 2002. « Diffusion of β-Lactam Antibiotics Through Oligomeric or Monomeric Porin Channels of Some Gram-Negative Bacteria ». *Current Microbiology* 45 (6): 0446-55. https://doi.org/10.1007/s00284-002-3778-6.

Niu, Chen, Katy M. Clemmer, Robert A. Bonomo, et Philip N. Rather. 2008. « Isolation and Characterization of an Autoinducer Synthase from Acinetobacter baumannii ». *Journal of Bacteriology* 190 (9): 3386-92. https://doi.org/10.1128/JB.01929-07.

Nolting, A., T. Dalla Costa, K. H. Rand, et H. Derendorf. 1996. « Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antibiotic Effect of Piperacillin in Vitro ». *Pharmaceutical Research* 13 (1): 91-96. https://doi.org/10.1023/a:1016085402278.

Okada, Ui, Eiki Yamashita, Arthur Neuberger, Mayu Morimoto, Hendrik W. van Veen, et Satoshi Murakami. 2017. « Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from Acinetobacter baumannii ». *Nature Communications* 8 (novembre): 1336. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01399-2.

Olaitan, Abiola O., Serge Morand, et Jean-Marc Rolain. 2014. « Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 5 (novembre). https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643.

Öncül, O., Ö. Keskin, H. V. Acar, Y. Küçükardalı, R. Evrenkaya, E. M. Atasoyu, C. Top, et al. 2002. « Hospital-Acquired Infections Following the 1999 Marmara Earthquake ». *Journal of Hospital Infection* 51 (1): 47-51. https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1205.

Orwa, J. A, C Govaerts, K Gevers, E Roets, A Van Schepdael, et J Hoogmartens. 2002. « Study of the Stability of Polymyxins B1, E1 and E2 in Aqueous Solution Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (1): 203-12. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00016-X.

Pagano, Mariana, Andreza Francisco Martins, et Afonso Luis Barth. 2016. « Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii ». *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (4): 785-92. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005.

Palmer, Lauren D., Erin R. Green, Jessica R. Sheldon, et Eric P. Skaar. 2019. « Assessing Acinetobacter baumannii virulence and persistence in a murine model of lung infection ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1946: 289-305. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9118-1_26.

Park, Sunok, Kyeong Min Lee, Yong Sun Yoo, Jung Sik Yoo, Jae Il Yoo, Hwa Su Kim, Yeong Seon Lee, et Gyung Tae Chung. 2011. « Alterations of gyrA, gyrB, and parC and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant Acinetobacter baumannii ». *Osong Public Health and Research Perspectives* 2 (3): 164-70. https://doi.org/10.1016/j.phrp.2011.11.040.

Pasterán, Fernando, Melina Rapoport, Alejandro Petroni, Diego Faccone, Alejandra Corso, Marcelo Galas, Miryam Vázquez, Adriana Procopio, Marta Tokumoto, et Viviana Cagnoni. 2006. « Emergence of PER-2 and VEB-1a in Acinetobacter baumannii Strains in the Americas ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (9): 3222-24. https://doi.org/10.1128/AAC.00284-06.

Paton, R., R. S. Miles, J. Hood, S. G. B. Amyes, R. S. Miles, et S. G. B. Amyes. 1993. « ARI 1: β-Lactamase-Mediated Imipenem Resistance in Acinetobacter Baumannii ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 2 (2): 81-87. https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90045-7.

Peleg, Anton Y., Anna de Breij, Mark D. Adams, Gustavo M. Cerqueira, Stefano Mocali, Marco Galardini, Peter H. Nibbering, et al. 2012. « The Success of Acinetobacter Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes ». *PLoS ONE* 7 (10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046984.

Peleg, Anton Y., Harald Seifert, et David L. Paterson. 2008. « Acinetobacter Baumannii: Emergence of a Successful Pathogen ». *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3): 538-82. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07.

Peng, Qin, Fei Lin, et Baodong Ling. 2020. « In Vitro Activity of Biofilm Inhibitors in Combination with Antibacterial Drugs against Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii ». *Scientific Reports* 10 (1): 18097. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75218-y.

Penwell, William F., Adam B. Shapiro, Robert A. Giacobbe, Rong-Fang Gu, Ning Gao, Jason Thresher, Robert E. McLaughlin, et al. 2015. « Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in Acinetobacter baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (3): 1680-89. https://doi.org/10.1128/AAC.04808-14.

Pichereau, Solen, Madhulatha Pantrangi, William Couet, Cedric Badiou, Gerard Lina, Sanjay K. Shukla, et Warren E. Rose. 2012. « Simulated Antibiotic Exposures in an In Vitro Hollow-Fiber Infection Model Influence Toxin Gene Expression and Production in

Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain MW2 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 140-47. https://doi.org/10.1128/AAC.05113-11.

Plachouras, D., M. Karvanen, L. E. Friberg, E. Papadomichelakis, A. Antoniadou, I. Tsangaris, I. Karaiskos, et al. 2009. « Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin Methanesulfonate and Colistin after Intravenous Administration in Critically Ill Patients with Infections Caused by Gram-Negative Bacteria ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (8): 3430-36. https://doi.org/10.1128/AAC.01361-08.

Playford, E. G., J. C. Craig, et J. R. Iredell. 2007. « Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii in Intensive Care Unit Patients: Risk Factors for Acquisition, Infection and Their Consequences ». *Journal of Hospital Infection* 65 (3): 204-11. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.11.010.

Poirel, L., A. Karim, A. Mercat, I. Le Thomas, H. Vahaboglu, C. Richard, et P. Nordmann. 1999. « Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Strain of Acinetobacter Baumannii Isolated from a Patient in France ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 (1): 157-58.

Poirel, Laurent, Olivier Menuteau, Nathalie Agoli, Christian Cattoen, et Patrice Nordmann. 2003. « Outbreak of Extended-Spectrum β-Lactamase VEB-1-Producing Isolates of Acinetobacter baumannii in a French Hospital ». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (8): 3542-47. https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3542-3547.2003.

Powers, Matthew Joseph, et M. Stephen Trent. 2018. « Expanding the Paradigm for the Outer Membrane: Acinetobacter Baumannii in the Absence of Endotoxin ». *Molecular Microbiology* 107 (1): 47-56. https://doi.org/10.1111/mmi.13872.

« Programme Prioritaire de Recherche (PPR) Antibiorésistance - I3M / front-office ». s. d. Consulté le 23 septembre 2021. https://i3m.aviesan.fr/index.php?pagendx=927.

Proulx, Ian Albert, Michaela Dehne, Javier Apfeld, et Veronica Godoy-Carter. 2020. « Acinetobacter Baumannii Virulence Assay in Caenorhabditis Elegans ». *The FASEB Journal* 34 (S1): 1-1. https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.00295.

Quale, John, Simona Bratu, David Landman, et Renuka Heddurshetti. 2003. « Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in Acinetobacter Baumannii Endemic in New York City ». *Clinical Infectious Diseases* 37 (2): 214-20. https://doi.org/10.1086/375821.

Queenan, Anne Marie, et Karen Bush. 2007. « Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases ». *Clinical Microbiology Reviews* 20 (3): 440-58. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07.

Rio-Marques, Laura, Axel Hartke, et Alain Bizzini. 2014. « The Effect of Inoculum Size on Selection of In Vitro Resistance to Vancomycin, Daptomycin, and Linezolid in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ». *Microbial Drug Resistance* 20 (6): 539-43. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0059.

Robbe-Saule, Marie, Jérémie Babonneau, Odile Sismeiro, Laurent Marsollier, et Estelle Marion. 2017. « An Optimized Method for Extracting Bacterial RNA from Mouse Skin Tissue Colonized by Mycobacterium ulcerans ». *Frontiers in Microbiology* 8: 512. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00512.

Ruiz, Marc, Sara Marti, Felipe Fernandez-Cuenca, Alvaro Pascual, et Jordi Vila. 2007. « Prevalence of ISAba1 in Epidemiologically Unrelated Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates ». *FEMS Microbiology Letters* 274 (1): 63-66. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00828.x.

Russo, Thomas A., Nicole R. Luke, Janet M. Beanan, Ruth Olson, Shauna L. Sauberan, Ulrike MacDonald, L. Wayne Schultz, Timothy C. Umland, et Anthony A. Campagnari. 2010. « The K1 Capsular Polysaccharide of Acinetobacter baumannii Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor ». *Infection and Immunity* 78 (9): 3993-4000. https://doi.org/10.1128/IAI.00366-10.

Sabet, Mojgan, Ziad Tarazi, et David C. Griffith. 2020. « Pharmacodynamics of Meropenem against Acinetobacter baumannii in a Neutropenic Mouse Thigh Infection Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64 (4): e02388-19. https://doi.org/10.1128/AAC.02388-19.

Sabnis, Akshay, Katheryn LH Hagart, Anna Klöckner, Michele Becce, Lindsay E Evans, R Christopher D Furniss, Despoina AI Mavridou, et al. 2021. « Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane ». Édité par Philip A Cole, Lianghui Gao, et Willem van Schaik. *eLife* 10 (avril): e65836. https://doi.org/10.7554/eLife.65836.

Salas, Jessica R, Majid Jaberi-Douraki, Xuesong Wen, et Victoriya V Volkova. 2020. « Mathematical modeling of the 'inoculum effect': six applicable models and the MIC advancement point concept ». *FEMS Microbiology Letters* 367 (5). https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa012.

Samad, Tahoura, Julia Y Co, Jacob Witten, et Katharina Ribbeck. 2019. « Mucus and Mucin Environments Reduce the Efficacy of Polymyxin and Fluoroquinolone Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa ». *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5 (3): 1189-94. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01054.

Sánchez-Encinales, Viviana, Rocío Álvarez-Marín, María Eugenia Pachón-Ibáñez, Felipe Fernández-Cuenca, Alvaro Pascual, José Garnacho-Montero, Luis Martínez-Martínez, et al. 2017. « Overproduction of Outer Membrane Protein A by Acinetobacter baumannii as a Risk Factor for Nosocomial Pneumonia, Bacteremia, and Mortality Rate Increase ». *The Journal of Infectious Diseases* 215 (6): 966-74. https://doi.org/10.1093/infdis/jix010.

Sanchez-Larrayoz, Amaro F., Noha M. Elhosseiny, Marc G. Chevrette, Yang Fu, Peter Giunta, Raúl G. Spallanzani, Keerthikka Ravi, Gerald B. Pier, Stephen Lory, et Tomás Maira-Litrán. 2017. « Complexity of Complement-Resistance Factors Expressed by Acinetobacter baumannii Needed for Survival in Human Serum ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 199 (8): 2803-14. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700877.

Sandri, Ana M., Cornelia B. Landersdorfer, Jovan Jacob, Márcio M. Boniatti, Micheline G. Dalarosa, Diego R. Falci, Tainá F. Behle, et al. 2013. « Population Pharmacokinetics of Intravenous Polymyxin B in Critically Ill Patients: Implications for Selection of Dosage Regimens ». *Clinical Infectious Diseases* 57 (4): 524-31. https://doi.org/10.1093/cid/cit334.

Sato, Yoshinori, Yuka Unno, Sayoko Kawakami, Tsuneyuki Ubagai, et Yasuo Ono. 2017. « Virulence Characteristics of Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates Vary with the Expression Levels of Omps ». *Journal of Medical Microbiology* 66 (2): 203-12. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000394.

Sawada, Isao, Hideaki Maseda, Taiji Nakae, Hiroo Uchiyama, et Nobuhiko Nomura. 2004. « A Quorum-Sensing Autoinducer Enhances the MexAB-OprM Efflux-Pump Expression without the MexR-Mediated Regulation in Pseudomonas Aeruginosa ». *Microbiology and Immunology* 48 (5): 435-39. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03533.x.

Segal, Heidi, E. C. Nelson, et B. Gay Elisha. 2004. « Genetic Environment and Transcription of ampC in an Acinetobacter baumannii Clinical Isolate ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (2): 612-14. https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.612-614.2004.

Seifert, H., R. Baginski, A. Schulze, et G. Pulverer. 1993. « The Distribution of Acinetobacter Species in Clinical Culture Materials ». *Zentralblatt Fur Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* 279 (4): 544-52. https://doi.org/10.1016/s0934-8840(11)80427-5.

Singh, Jennifer K., Felise G. Adams, et Melissa H. Brown. 2019. « Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in Acinetobacter Baumannii ». *Frontiers in Microbiology* 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03301.

Siroy, Axel, Pascal Cosette, Damien Seyer, Christelle Lemaître-Guillier, David Vallenet, Alain Van Dorsselaer, Sophie Boyer-Mariotte, Thierry Jouenne, et Emmanuelle Dé. 2006. « Global Comparison of the Membrane Subproteomes between a Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii Strain and a Reference Strain ». *Journal of Proteome Research* 5 (12): 3385-98. https://doi.org/10.1021/pr060372s.

Skerniškytė, Jūratė, Emilija Karazijaitė, Asta Lučiūnaitė, et Edita Sužiedėlienė. 2021. « OmpA Protein-Deficient Acinetobacter baumannii Outer Membrane Vesicles Trigger Reduced Inflammatory Response ». *Pathogens* 10 (4). https://doi.org/10.3390/pathogens10040407.

Smani, Younes, Anna Fàbrega, Ignasi Roca, Viviana Sánchez-Encinales, Jordi Vila, et Jerónimo Pachón. 2014. « Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (3): 1806-8. https://doi.org/10.1128/AAC.02101-13.

Smith, A. 2005. « Biofilms and Antibiotic Therapy: Is There a Role for Combating Bacterial Resistance by the Use of Novel Drug Delivery Systems? » *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (10): 1539-50. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.007.

Smith, Kenneth P., et James E. Kirby. 2018. « The Inoculum Effect in the Era of Multidrug Resistance: Minor Differences in Inoculum Have Dramatic Effect on MIC Determination ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (8). https://doi.org/10.1128/AAC.00433-18.

Soon, Rachel L., Roger L. Nation, Stewart Cockram, Jennifer H. Moffatt, Marina Harper, Ben Adler, John D. Boyce, Ian Larson, et Jian Li. 2011. « Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant Acinetobacter baumannii cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (1): 126-33. https://doi.org/10.1093/jac/dkq422.

Srivastava, Shashikant, Jotam G. Pasipanodya, Geetha Ramachandran, Devyani Deshpande, Stephen Shuford, Howland E. Crosswell, Kayle N. Cirrincione, Carleton M. Sherman, Soumya Swaminathan, et Tawanda Gumbo. 2016. « A Long-Term Co-Perfused Disseminated Tuberculosis-3D Liver Hollow Fiber Model for Both Drug Efficacy and Hepatotoxicity in Babies ». *EBioMedicine* 6 (avril): 126-38. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.040.

Srivastava, Shashikant, Jotam Pasipanodya, Carleton M. Sherman, Claudia Meek, Richard Leff, et Tawanda Gumbo. 2015. « Rapid Drug Tolerance and Dramatic Sterilizing Effect of Moxifloxacin Monotherapy in a Novel Hollow-Fiber Model of Intracellular Mycobacterium kansasii Disease ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (4): 2273-79. https://doi.org/10.1128/AAC.04441-14.

Subhadra, Bindu, Man Hwan Oh, Chul Hee Choi, Bindu Subhadra, Man Hwan Oh, et Chul Hee Choi. 2016. « Quorum Sensing in Acinetobacter</Em>: With Special Emphasis on Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and Quorum Quenching ». *AIMS Microbiology* 2 (1): 27-41. https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.27.

Sugawara, Etsuko, et Hiroshi Nikaido. 2012. « OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of Acinetobacter baumannii ». *Journal of Bacteriology* 194 (15): 4089-96. https://doi.org/10.1128/JB.00435-12.

« Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2018 ». 2019. European Centre for Disease Prevention and Control. 18 novembre 2019. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018.

Tam, Vincent H., Amy N. Schilling, Giao Vo, Samer Kabbara, Andrea L. Kwa, Nathan P. Wiederhold, et Russell E. Lewis. 2005. « Pharmacodynamics of Polymyxin B against Pseudomonas aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (9): 3624-30. https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3624-3630.2005.

Tängdén, Thomas, Carina Vingsbo Lundberg, Lena E. Friberg, et Angela Huttner. 2020. « How Preclinical Infection Models Help Define Antibiotic Doses in the Clinic ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 56 (2): 106008. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106008.

Theuretzbacher, Ursula, Simon Gottwalt, Peter Beyer, Mark Butler, Lloyd Czaplewski, Christian Lienhardt, Lorenzo Moja, et al. 2019. « Analysis of the Clinical Antibacterial and Antituberculosis Pipeline ». *The Lancet Infectious Diseases* 19 (2): e40-50. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30513-9.

Thomson, Kenneth S., et Ellen Smith Moland. 2001. « Cefepime, Piperacillin-Tazobactam, and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (12): 3548-54. https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3548-3554.2001.

Tiku, Varnesh, Eric M. Kofoed, Donghong Yan, Jing Kang, Min Xu, Mike Reichelt, Ivan Dikic, et Man-Wah Tan. 2021. « Outer Membrane Vesicles Containing OmpA Induce Mitochondrial Fragmentation to Promote Pathogenesis of Acinetobacter Baumannii ». *Scientific Reports* 11 (1): 618. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79966-9.

Tipton, Kyle A., Chui-Yoke Chin, Marjan Farokhyfar, David S. Weiss, et Philip N. Rather. 2018. « Role of Capsule in Resistance to Disinfectants, Host Antimicrobials, and Desiccation in Acinetobacter baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (12). https://doi.org/10.1128/AAC.01188-18.

Tomaras, Andrew P., Jared L. Crandon, Craig J. McPherson, Mary Anne Banevicius, Steven M. Finegan, Rebecca L. Irvine, Matthew F. Brown, John P. O'Donnell, et David P. Nicolau. 2013. « Adaptation-Based Resistance to Siderophore-Conjugated Antibacterial Agents by Pseudomonas Aeruginosa ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (9): 4197-4207. https://doi.org/10.1128/AAC.00629-13.

Trebosc, Vincent, Sarah Gartenmann, Marcus Tötzl, Valentina Lucchini, Birgit Schellhorn, Michel Pieren, Sergio Lociuro, et al. 2019. « Dissecting Colistin Resistance Mechanisms in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii Clinical Isolates ». *MBio* 10 (4). https://doi.org/10.1128/mBio.01083-19.

Tsuji, Brian T., Jason M. Pogue, Alexandre P. Zavascki, Mical Paul, George L. Daikos, Alan Forrest, Daniele R. Giacobbe, et al. 2019. « International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy

(ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-Infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP) ». *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 39 (1): 10-39. https://doi.org/10.1002/phar.2209.

Udekwu, Klas I., Nicholas Parrish, Peter Ankomah, Fernando Baquero, et Bruce R. Levin. 2009. « Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (4): 745-57. https://doi.org/10.1093/jac/dkn554.

Uppalapati, Siva R., Abhiroop Sett, et Ranjana Pathania. 2020. « The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of Acinetobacter Baumannii Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen ». *Frontiers in Microbiology* 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589234.

Vahaboglu, H, R Oztürk, G Aygün, F Coşkunkan, A Yaman, A Kaygusuz, H Leblebicioglu, I Balik, K Aydin, et M Otkun. 1997. « Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial Acinetobacter and Pseudomonas aeruginosa isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (10): 2265-69.

Vázquez-Ucha, Juan Carlos, Marta Martínez-Guitián, María Maneiro, Kelly Conde-Pérez, Laura Álvarez-Fraga, Gabriel Torrens, Antonio Oliver, et al. 2019. « Therapeutic Efficacy of LN-1-255 in Combination with Imipenem in Severe Infection Caused by Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (10): e01092-19. https://doi.org/10.1128/AAC.01092-19.

Vila, J., A. Marcos, F. Marco, S. Abdalla, Y. Vergara, R. Reig, R. Gomez-Lus, et T. Jimenez de Anta. 1993. « In Vitro Antimicrobial Production of Beta-Lactamases, Aminoglycoside-Modifying Enzymes, and Chloramphenicol Acetyltransferase by and Susceptibility of Clinical Isolates of Acinetobacter Baumannii ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (1): 138-41. https://doi.org/10.1128/aac.37.1.138.

Vila, Jordi, Sara Martí, et Javier Sánchez-Céspedes. 2007. « Porins, Efflux Pumps and Multidrug Resistance in Acinetobacter Baumannii ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (6): 1210-15. https://doi.org/10.1093/jac/dkl509.

Villalón, Pilar, Montserrat Ortega, Juan A. Sáez-Nieto, Gema Carrasco, María J. Medina-Pascual, Noelia Garrido, et Sylvia Valdezate. 2019. « Dynamics of a Sporadic Nosocomial Acinetobacter Calcoaceticus – Acinetobacter Baumannii Complex Population ». *Frontiers in Microbiology* 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00593.

Villegas, Maria Virginia, et Alan I. Hartstein. 2003. « Acinetobacter Outbreaks, 1977-2000 ». *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24 (4): 284-95. https://doi.org/10.1086/502205.

Vogelman, B., S. Gudmundsson, J. Leggett, J. Turnidge, S. Ebert, et W. A. Craig. 1988. « Correlation of Antimicrobial Pharmacokinetic Parameters with Therapeutic Efficacy in an Animal Model ». *The Journal of Infectious Diseases* 158 (4): 831-47. https://doi.org/10.1093/infdis/158.4.831.

Wang, Jann-Tay, Lawrence Clifford McDonald, Shan-Chwen Chang, et Monto Ho. 2002. « Community-Acquired Acinetobacter Baumannii Bacteremia in Adult Patients in Taiwan ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (4): 1526-29. https://doi.org/10.1128/jcm.40.4.1526-1529.2002.

Wang, Yue, Peng Hao, Bo Lu, Hua Yu, Wenfang Huang, Hongliang Hou, et Kerong Dai. 2010. « Causes of Infection after Earthquake, China, 2008 ». *Emerging Infectious Diseases* 16 (6): 974-75. https://doi.org/10.3201/eid1606.091523.

Warner, Wayne A., Shan N. Kuang, Rina Hernandez, Melissa C. Chong, Peter J. Ewing, Jen Fleischer, Jia Meng, et al. 2016. « Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter baumannii isolates obtained from two hospital outbreaks in Los Angeles County, California, USA ». *BMC Infectious Diseases* 16 (mai). https://doi.org/10.1186/s12879-016-1526-y.

White, C A, R D Toothaker, A L Smith, et J T Slattery. 1987. « Correction for bacterial loss in in vitro dilution models. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31 (11): 1859-60.

Whitehead, Neil A., Anne M.L. Barnard, Holly Slater, Natalie J.L. Simpson, et George P.C. Salmond. 2001. « Quorum-sensing in Gram-negative bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 25 (4): 365-404. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x.

Wong, Darren, Travis B. Nielsen, Robert A. Bonomo, Paul Pantapalangkoor, Brian Luna, et Brad Spellberg. 2017. « Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges ». *Clinical Microbiology Reviews* 30 (1): 409-47. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16.

Wong, Ting Y., Jesse M. Hall, Evan S. Nowak, Dylan T. Boehm, Laura A. Gonyar, Erik L. Hewlett, Joshua C. Eby, Mariette Barbier, et F. Heath Damron. 2019. « Analysis of the In Vivo Transcriptome of Bordetella Pertussis during Infection of Mice ». *MSphere* 4 (2). https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00154-19.

Woods, D. D. 1940. « The Relation of p-aminobenzoic Acid to the Mechanism of the Action of Sulphanilamide ». *British Journal of Experimental Pathology* 21 (2): 74-90.

Wright, Gerard D. 2005. « Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies, 57 (10): 1451-70. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002.

———. 2007. « The Antibiotic Resistome: The Nexus of Chemical and Genetic Diversity ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (3): 175-86. https://doi.org/10.1038/nrmicro1614.

Xiong, Yan Q., Angeles Estellés, L. Li, W. Abdelhady, R. Gonzales, Arnold S. Bayer, Edgar Tenorio, Anton Leighton, Stefan Ryser, et Lawrence M. Kauvar. 2017. « A Human Biofilm-Disrupting Monoclonal Antibody Potentiates Antibiotic Efficacy in Rodent Models of both Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii Infections ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (10): e00904-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00904-17.

Yokota, Shin-ichi, Hiroshi Hakamada, Soh Yamamoto, Toyotaka Sato, Tsukasa Shiraishi, Masaaki Shinagawa, et Satoshi Takahashi. 2018. « Release of Large Amounts of Lipopolysaccharides from Pseudomonas Aeruginosa Cells Reduces Their Susceptibility to Colistin ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 51 (6): 888-96. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.004.

Yokoyama, Yuta, Kazuaki Matsumoto, Kazuro Ikawa, Erika Watanabe, Akari Shigemi, Yasuhiro Umezaki, Koyo Nakamura, Keiichiro Ueno, Norifumi Morikawa, et Yasuo Takeda. 2014. « Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Evaluation of Sulbactam against Acinetobacter Baumannii in in Vitro and Murine Thigh and Lung Infection Models ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 43 (6): 547-52. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.012.

Yong, Dongeun, Jong Hee Shin, Sinyoung Kim, Youngsik Lim, Jong Hwa Yum, Kyungwon Lee, Yunsop Chong, et Adolf Bauernfeind. 2003. « High Prevalence of PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Acinetobacter spp. in Korea ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5): 1749-51. https://doi.org/10.1128/AAC.47.5.1749-1751.2003.

Zavascki, Alexandre P., Luciano Z. Goldani, Guoying Cao, Silvana V. Superti, Larissa Lutz, Afonso L. Barth, Fabiano Ramos, Márcio M. Boniatti, Roger L. Nation, et Jian Li. 2008. « Pharmacokinetics of Intravenous Polymyxin B in Critically Ill Patients ». *Clinical Infectious Diseases* 47 (10): 1298-1304. https://doi.org/10.1086/592577.

Zhang, B., Z. Liu, Z. Lin, X. Zhang, et W. Fu. 2012. « Microbiologic Characteristics of Pathogenic Bacteria from Hospitalized Trauma Patients Who Survived Wenchuan Earthquake ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31 (10): 2529-35. https://doi.org/10.1007/s10096-012-1591-0.

Zhang, Nan, Xiaomei Ye, Yuzhi Wu, Zilong Huang, Xiaoyan Gu, Qinren Cai, Xiangguang Shen, Hongxia Jiang, et Huanzhong Ding. 2017. « Determination of the Mutant Selection Window and Evaluation of the Killing of Mycoplasma Gallisepticum by Danofloxacin, Doxycycline, Tilmicosin, Tylvalosin and Valnemulin ». *PLOS ONE* 12 (1): e0169134. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169134.

Zhou, Jian, Kimberly R. Ledesma, Kai-Tai Chang, Henrietta Abodakpi, Song Gao, et Vincent H. Tam. 2017. « Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Minocycline against Acinetobacter Baumannii in a Neutropenic Murine Pneumonia Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (5). https://doi.org/10.1128/AAC.02371-16.

ABSTRACT

Antibiotic resistance has become a major public health concern and is the subject of national and European action plans. Since economic logic does not encourage large pharmaceutical groups to invest in research in infectious diseases, resistance is appearing faster than new antibiotics, leading to situations of therapeutic impasse. Thus, in this context, older antibiotics such as polymyxins, often abandoned because of their toxicity, constitute treatment of last resort. Polymyxin B is one of the main antibiotics used to fight pulmonary infections caused by multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*, which are found in intensive care patients. However, several parameters can influence the efficacy of antibiotics such as bacterial density at the infection site, which varies over time: in case of effective treatment and/or immune response, the bacterial density decreases while in the opposite case, it increases. However, a high bacterial density is often associated with decreased antibiotic efficacy: this microbiological phenomenon is called the inoculum effect. Thus, in this work, the impact of the size of the *A. baumannii* inoculum on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of polymyxin B was evaluated through two main studies:

1. The *in vitro* pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) study of polymyxin B against a clinical strain of *A. baumannii* susceptible to polymyxin B. For this purpose, time-kill curves up to 30h were performed in the presence of polymyxin B (from 0.125 to 128 mg/L) and four inocula of *A. baumannii* (from 10^5 to 10^8 CFU/mL). These experimental data showed a marked inoculum effect especially after analysis of the results by semi-mechanistic PKPD approaches. Indeed, the inoculum effect was characterized in the model by an increase of the concentration allowing to obtain 50% of the maximal effect (EC_{50}) of polymyxin B by a factor of 17 in the presence of the highest inoculum, compared to the lowest. To understand the mechanisms of adaptation to polymyxin B of *A. baumannii*, whole genome sequencing and expression quantification of the main resistance genes described in this germ were performed. These experiments showed that the adaptive resistance observed was not due to the establishment of these mechanisms.

2. The *in vivo* PK/PD study of polymyxin B in two reference models of *A. baumannii* infection. First, neutropenic murine models of thigh and lung infections were developed. Then, the *in vivo* efficacy of polymyxin B after a single subcutaneous administration was

studied over 24 hours. These two models showed that the efficacy of polymyxin B was higher in the thigh infection model than in the lung infection model. In addition, the inoculum effect of *A. baumannii* (10^6 and 10^7 CFU/thigh) in the presence of polymyxin B was investigated in mice with a thigh infection. This PD study was then coupled with a PK study performed at different doses (1, 15 and 40 mg/kg) to determine the PK parameters of polymyxin B. These *in vivo* PK/PD data were initially analyzed with the semi-mechanistic PKPD model developed from *in vitro* data. Since the *in vitro* model did not adequately describe the *in vivo* data, a new model was developed using the *in vivo* data. Preliminary results showed that the inoculum effect of *A. baumannii* on polymyxin B efficacy is less significant *in vivo* than *in vitro*. Further experiments with a third inoculum are planned to better characterize this inoculum effect *in vivo*.

Keywords: Inoculum effect, *Acinetobacter baumannii*, polymyxin B, PK/PD modeling, pharmacokinetics, pharmacodynamic

RESUME

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique majeur faisant l'objet de mesures au niveau national et européen. La logique économique n'incitant pas les grands groupes pharmaceutiques à investir dans la recherche en infectiologie, les résistances apparaissent plus vite que les nouveaux antibiotiques, créant des situations d'impasses thérapeutiques. Ainsi, dans ce contexte de pénurie, des antibiotiques plus anciens comme les polymyxines, souvent délaissés à cause de leur toxicité, constituent parfois le traitement de dernier recours. La polymyxine B est l'un des principaux antibiotiques utilisés pour lutter contre les infections pulmonaires causées par les souches multirésistantes d'*Acinetobacter baumannii*, rencontrées chez les patients de réanimation. Cependant, plusieurs paramètres peuvent influencer l'efficacité des antibiotiques, comme par exemple la densité bactérienne au site infectieux qui varie au cours du temps : en cas de traitement et/ou de réponse immunitaire efficaces la densité bactérienne diminue, dans le cas contraire, elle augmente. Or, une forte densité bactérienne est souvent associée à une diminution de l'efficacité des antibiotiques : ce phénomène microbiologique est appelé l'effet inoculum. Ainsi dans ce travail, l'impact de la taille de l'inoculum d'*A. baumannii* sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la polymyxine B a été évalué à travers deux études principales :

1. L'étude pharmacocinétique/pharmacodynamique (PK/PD) *in vitro* de la polymyxine B contre une souche clinique d'*A. baumannii* sensible à la polymyxine B. Pour cela, des courbes de bactéricidie sur 30h en présence de polymyxine B (0,125 à 128 mg/L) et de quatre inocula croissants d'*A. baumannii* (10^5 à 10^8 UFC/mL) ont été réalisées. Ces données expérimentales ont montré un effet inoculum marqué notamment après analyse des résultats par des approches PKPD semi-mécanistiques. En effet, l'effet inoculum a été caractérisé dans le modèle par une augmentation de la concentration permettant l'obtention de 50% de l'effet maximal (EC_{50}) de la polymyxine B par un facteur 17 en présence du plus fort inoculum, comparativement au plus faible. Afin de comprendre les mécanismes d'adaptation à la polymyxine B mis en place par *A. baumannii,* un séquençage du génome entier et une évaluation de l'expression des principaux gènes de résistance décrits chez ce germe ont été réalisés. Ces expérimentations ont montré que la résistance adaptative observée n'était pas due à la mise en place de ces mécanismes.

2. L'étude PK/PD *in vivo* de la polymyxine B dans deux modèles de référence d'infection à *A. baumannii*. Dans premier temps, les modèles murins neutropéniques d'infection de la cuisse et d'infection pulmonaire ont été mis au point. Puis, l'efficacité *in vivo* sur 24h de la polymyxine B administrée par voie sous-cutanée a été étudiée. Ces deux modèles ont montré que l'efficacité de la polymyxine était supérieure dans le modèle d'infection de la cuisse que dans le modèle d'infection pulmonaire. De plus, une étude d'effet inoculum d'*A. baumannii* (10^6 et 10^7 UFC/cuisse) en présence de polymyxine B a été réalisée *in vivo* chez la souris présentant une infection de la cuisse. Cette étude PD a ensuite été couplée à une étude PK qui a été réalisée à 3 doses (1, 15 et 40 mg/kg) afin de déterminer les paramètres PK de la polymyxine B. Ces données PK/PD *in vivo* ont été initialement analysées avec le modèle PKPD semi-mécanistique développé à partir des données *in vitro*. Le modèle *in vitro* ne permettant pas de décrire correctement les données *in vivo*, un nouveau modèle a été développé à partir des données *in vivo*. Les résultats préliminaires montrent que l'effet inoculum d'*A. baumannii* sur l'efficacité de la polymyxine B est moins important *in vivo*. Des expérimentations supplémentaires avec un troisième inoculum sont à prévoir afin de mieux caractériser cet effet inoculum *in vivo.*

Mots-clés : Effet inoculum, *Acinetobacter baumannii*, polymyxine B, modélisation PK/PD, pharmacocinétique, pharmacodynamie