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 649 :
« *Rosalind Franklin* » - Énergie – Environnement - Biosanté

Secteur de Recherche : Pharmacologie et Sciences du Médicament

Présentée par :

Mathilde LACROIX

****

Apport de la modélisation PK/PD de données *in vitro* et *in vivo* pour lutter contre la résistance bactérienne

****

Directeurs de Thèse :
William COUET, Alexia CHAUZY, Hamasseh SHIRVANI

****

Soutenue le 15/12/2023

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Président	**Mehdi OUALHA**	PU-PH, Université Paris Cité
Rapporteur	**Vincent CATTOIR**	PU-PH, Université de Rennes
Rapporteur	**Aude FERRAN**	MCU-HDR, ENVT de Toulouse
Directeur de thèse	**William COUET**	PU-PH, Université de Poitiers
Directeur de thèse	**Alexia CHAUZY**	MCU, Université de Poitiers
Directeur de thèse	**Hamasseh SHIRVANI**	Dr, Institut Roche

Remerciements

Au Pr Mehdi Oualha, merci très sincèrement d'avoir accepté de prendre part et de présider ce jury.

Au Dr Aude Ferran et au Pr Vincent Cattoir, merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

I would like to thanks the Roche External Alliances team and especially Dr Guillaume Daniel for his precious help in the creation of this CIFRE project.

Thanks to Roche for this PhD opportunity and especially the Antibiotic team of Basel, for their welcome during my master internship and during a part of this PhD. And many thanks to Dr Kenneth Bradley for his support during this PhD.

Un grand merci à l'Institut Roche pour ce projet CIFRE et pour votre accueil lors de ma visite. Je remercie tout particulièrement Nathalie, merci pour ton aide et ta disponibilité tout au long de cette thèse.

Au Pr Sandrine Marchand, merci pour ton accueil au sein du laboratoire, pour ton soutien et ta bienveillance.

To Andrej, thank you for your time, your advice and for guiding me through the transcriptomics journey, which was a completely new field for me. Many thanks again.

A Pauline et Séverine, merci pour votre accueil pendant mon stage de master, votre soutien pendant cette thèse et votre amitié. J'espère qu'on se reverra bientôt !

To Claudia and Caterina, thank you so much for this PhD, for your trust and support during it. You made me discover the PK/PD during my master internship, and I hope be able to continue my journey into this captivating field. Thanks for your friendship, I hope we will see each other again (soon!).

Au Dr Hamasseh Shirvani, ma co-directrice de thèse, merci pour la confiance que tu m'as témoignée durant ce projet, ta gentillesse et ton soutien.

Au Pr William Couet, mon directeur de thèse, merci sincèrement pour l'accompagnement tout au long de cette thèse et pour tous vos conseils et remarques constructives. J'espère que cette dernière thèse restera un bon souvenir pour vous. Je vous souhaite une très joyeuse retraite.

Au Dr Alexia Chauzy, ma co-directrice de thèse, pour m'avoir appris la modélisation, pour tes conseils, ta gentillesse, ta disponibilité tout au long de cette thèse, et pour ta patience lors des nombreuses relectures de ce travail. Merci infiniment.

A toutes les personnes (passées et présentes) de l'U1070, aux doctorants, post-docs et aux M2, qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Merci pour votre accueil chaleureux, votre aide et pour les bons moments.

A Jérémy pour ta bonne humeur et ton aide précieuse pour ce projet.

Je remercie particulièrement Adrien, Anissa, Carine, Farras, Frédéric, Grace, Guillermo, Julian, Jonathan, Jennifer, Julie, Luc, Muriel, Noémie, Rana, Romain, Théo, Tom, Vincent et Zahyra pour l'aide, la bonne humeur, les soirées et tous les bons moments. Je garderais de très bons souvenirs de ma thèse grâce à vous.

A toutes les amitiés que j'ai pu créer durant mon parcours et spécialement Charlotte, Clara, Corentin, Estelle, Marie, Océane, et Perrine. J'espère qu'on gardera contact et qu'on se recroisera !

A mes amies Claire, Estelle, Valentine et Marianne, pour tous nos bons moments (et les prochains !) et pour votre soutien, merci infiniment.

A mes proches et ma famille, pour votre présence, vos encouragements et pour les nombreux bons moments passés ensembles.

A mes sœurs Amélie, Clémence et Clotilde, mes beaux-frères David et Florent, et à Julia nouvellement arrivée dans la famille, pour votre amour, votre présence et votre soutien.

A mes parents Béatrice et Marcel, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont toujours soutenue. Je voulais simplement vous dire que je vous aime et je vous dédie ce travail.

« La science ne renverse pas à mesure ses édifices ; mais elle y ajoute sans cesse de nouveaux étages et, à mesure qu'elle s'élève davantage, elle aperçoit des horizons plus élargis. »

Berthelot, Marcellin « Evolution des sciences au XIXème siècle », Science et libre pensée, C. Lévy (Paris), 1905, p227

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

LISTE DES PUBLICATIONS **10**

LISTE DES COMMUNICATIONS **11**

LISTE DES ABREVIATIONS **12**

LISTE DES TABLES **14**

LISTE DES FIGURES **15**

INTRODUCTION **18**

LE DEVELOPPEMENT DES ANTIBIOTIQUES ET L'ANTIBIORESISTANCE 19

ACINETOBACTER BAUMANNII 23

1. HISTORIQUE *23*

2. CARACTÉRISTIQUES *23*

3. EPIDÉMIOLOGIE *25*

4. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE *27*

5. FACTEURS DE VIRULENCE *28*

6. TRAITEMENT *29*

LA POLYMYXINE B 30

1. HISTORIQUE *30*

2. PROPRIÉTÉ PHYSICO-CHIMIQUE *31*

3. MÉCANISME D'ACTION *32*

3.1. Lyse des membranes 32

3.2. Inhibition de la respiration bactérienne 33

3.3. Production de radicaux libre d'oxygène 34

3.4. Action sur la division cellulaire 34

3.5. Liaison aux ribosomes 34

4. UTILISATION EN CLINIQUE *35*

5. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DÉVELOPPÉS PAR A. BAUMANNII VIS-À-VIS DES POLYMYXINES *36*

5.1. Perte des LOS 36

5.2. Mutation dans *pmrA/pmrB* 37

5.3. Plasmide mcr-1 38

EVALUATION PK/PD *IN VITRO* DES ANTIBIOTIQUES 39

1. DÉTERMINATION DE LA CMI *40*

1.1. Méthodes avec gradients 40

1.2. La CMI en milieu liquide ou solide (micro-dilution) 41

2. LES INDICES PK/PD *42*

3. COURBE DE BACTÉRICIDIE (TIME-KILL) 44
3.1. Time-kill en condition statique 44
3.2. Time-kill en condition dynamique 45
3.2.1. Le système à un compartiment 45
3.2.2. Système à deux compartiments 45
4. LES MODÈLES SEMI-MÉCANISTIQUES 46
4.1. Le modèle bactérien 46
4.2. Le modèle PK 47
4.3. Le modèle PK/PD 47
4.4. Les modèles PK/PD décrivant la résistance aux antibiotiques 48
4.4.1. Le modèle à hétéro-résistance 48
4.4.2. Le modèle d'adaptation 50
5. SIMULATION PK/PD 51
IMPACT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES IN VITRO SUR LA RELATION PK/PD DES ANTIBIOTIQUES 52
1. EFFET DU MILIEU DE CULTURE 53
1.1. Effet de la concentration en nutriments des milieux sur la croissance bactérienne 53
1.2. Effet de la concentration en nutriments des milieux sur le métabolisme bactérien 54
1.3. Effet du milieu de culture sur l'effet des antibiotiques 56
1.3.1. Milieux appauvris 56
1.3.2. Milieux supplémentés 56
1.3.3. Milieux proche des milieux biologiques 57
2. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE 58
2.1. La température 58
2.2. Niveau d'oxygène 59
3. CULTURE EN BIOFILM VERSUS PLANCTONIQUE 61
4. EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM 64
OBJECTIF 68
TRAVAIL EXPERIMENTAL 70
Article n°1: A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model to Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In vitro 71
1. ABSTRACT 73
2. INTRODUCTION 74
3. MATERIALS AND METHODS 75
3.1. Chemicals and bacterial isolates 75
3.2. Determination of PMB minimal inhibitory concentrations (MICs) 75
3.3. Time-kill kinetics curves (TKC) experiments 75
3.4. Pharmacodynamic model 76
3.5. Simulations of CFU versus time profiles 77
3.6. Quantification of the expression of PMB resistance genes and DNA sequencing 77

4. RESULTS 77
4.1. MIC determinations 77
4.2. Time-kill curves (TKC) experiments 77
4.3. Pharmacodynamic model and simulations 78
4.4. Expression of PMB resistance genes and genetic modifications in PMB resistance genes 80
5. TABLES & FIGURES 81
6. DISCUSSION 84
7. REFERENCES 88
8. SUPPLEMENTAL MATERIAL 91
Article n°2: Impact of nutritional factors on the in vitro PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of Acinetobacter baumannii 99
1. ABSTRACT 101
2. INTRODUCTION 102
3. MATERIALS AND METHODS 103
3.1. Chemical and strains 103
3.2. MIC determination 103
3.3. Time-kill experiments with various dilutions of CAMHB 104
3.4. Time-kill experiments with CAMHB dilutions and cations compensation 104
3.5. Pharmacodynamic model 105
3.6. Simulation of bacterial killing rate at different PMB concentrations 106
4. RESULTS 106
4.1. Medium effect on MIC 106
4.2. TK results with CAMHB dilutions 107
4.3. Time-kill experiments with CAMHB dilutions and cations compensation 107
4.4. PK/PD modelling of the medium dilution effect 108
4.4.1. Effect of CAMHB dilution on model parameters 108
4.4.2. Dilution effect on PMB kill rate 109
5. TABLE & FIGURES 110
6. DISCUSSION 114
7. REFERENCES 117
8. SUPPLEMENTAL MATERIAL 120
Article n°3: In vitro PK/PD modelling of mucin effect on polymyxin B against Acinetobacter baumannii 132
1. ABSTRACT 135
2. INTRODUCTION 136
3. MATERIALS AND METHODS 137
3.1. Chemicals and strains 137
3.2. MIC determination 137
3.3. PMB binding to mucin 137
3.4. Time-kill experiments (TK) 138

3.5. Pharmacodynamic modelling ... 139
4. RESULTS ... 141
4.1. PMB binding to mucin ... 141
4.2. Mucin effect on MIC ... 141
4.3. TK experiment and PK/PD modelling ... 141
4.4. Characterization of PMB resistance ... 142
5. TABLES & FIGURES ... 144
6. DISCUSSION ... 150
7. REFERENCES ... 153
8. SUPPLEMENTAL MATERIAL ... 156
Article n°4 : Resistance characterisation of Acinetobacter baumannii with Polymyxin B to support in vitro semi-mechanistic PK/PD modelling ... 166
1. ABSTRACT ... 169
2. INTRODUCTION ... 170
3. MATERIALS AND METHODS ... 172
3.1. Chemical and strains ... 172
3.2. Sequencing ... 172
3.3. Bacterial samples preparation for transcriptomics ... 173
3.4. RNA extraction and RNA sequencing ... 174
3.5. RNA sequencing analysis ... 174
3.6. Confocal microscopy ... 175
4. RESULTS ... 176
4.1. Strain characterization ... 176
4.2. Time-kill ... 176
4.3. Transcriptomic analysis ... 176
4.3.1. Global expression trends ... 176
4.3.2. Modules analysis for AB121-D0 ... 177
4.3.3. Modules analysis for AB122-D12 ... 178
4.4. Confocal microscopy ... 179
5. FIGURES ... 179
6. DISCUSSION ... 184
7. REFERENCES ... 189
8. SUPPLEMENTAL MATERIAL ... 194
DISCUSSION ET CONCLUSION ... 214
DISCUSSION ... 215
1. Apport de la modélisation PK/PD semi-mécanistique ... 215
1.1. Modélisation PD *in vitro* de l'effet inoculum ... 215
1.2. Modélisation PD de l'effet de la concentration en nutriments des milieux de culture ... 219
1.3. Modélisation PD de l'effet de la mucine ... 223
2. Limite de la modélisation PD ... 226

2.1. Choix de la structure du modèle PD 226
2.2. Apport des données mécanistiques dans la modélisation PD 229
3. Corrélation PK/PD in vitro / in vivo 235
CONCLUSION 249
ANNEXE 251
ANNEXE 252
1. Matériels et Méthodes des expériences PK/PD in vivo 252
1.1. Produits chimiques et souches 252
1.2. Modèle d'infection de souris neutropéniques 252
1.2.1. Modèle d'infection de la cuisse 253
1.2.2. Modèle d'infection pulmonaire 253
1.2.3. Traitement par la PMB et prélèvements PD 253
1.3. Modèle PBPK 253
2. Résultats PD in vivo 255
3. Simulation PK/PD 255
RÉFÉRENCES 257
REFERENCES 258
RÉSUMÉ 284

Liste des publications

Akrong G, Chauzy A, Aranzana Climent V, **Lacroix M,** Deroche L, Prouvensier L, Buyck JM, Couet W, Marchand S, A New Pharmacokinetic Pharmacodynamic Model To Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In Vitro Antimicrob Agents Chemother 2022 Jan 18 66 1 e 0178921 doi 10 1128 /AAC 01789 21 Epub 2021 Nov 15 PMID 34780268 PMCID PMC 8765416

Lacroix M, Moreau J, Zampaloni C, Bissantz C, Shirvani H, Marchand S, Couet W, Chauzy A. Impact of nutritional factors on the *in vitro* PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of *Acinetobacter baumannii*. Article soumis

Lacroix M, Moreau J, Zampaloni C, Bissantz C, Mirfendereski H, Shirvani H, Marchand S, Couet W, Chauzy A. *In vitro* PK/PD modelling of mucin effect on polymyxin B against *A. baumannii* Article en préparation

Lacroix M, Trauner A, Clarhaut J, Moreau J, Zampaloni C, Bissantz C, Shirvani H, Marchand S, Couet W, Chauzy A. Resistance characterisation of *Acinetobacter baumannii* with Polymyxin B to support *in vitro* semi-mechanistic PK/PD modelling. Article en préparation

Liste des communications

➢ Communications orales:

*Innovative preclinical PK/PD studies session - **Mathilde Lacroix,** Andrej Trauner, Jonathan Clarhaut, Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy. Transcriptomic data to support in vitro semi-mechanistic PK/PD modelling of polymyxin B against A. baumannii -- 33rd International ECCMID congress April 2023 Copenhagen, Denmark*

*Young Investigator Oral session - **Mathilde Lacroix,** Andrej Trauner, Jonathan Clarhaut, Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy. Transcriptomic data to support in vitro semi-mechanistic PK/PD modelling of polymyxin B against A. baumannii -- ISAP annual meeting April 2023, Copenhagen, Denmark*

*Young Investigator Oral session - **Mathilde Lacroix,** Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy. In vitro PK/PD modelling of polymyxin B against resistant strain of A. baumannii in presence of mucin -- ISAP annual meeting April 2022, Porto Salvo, Portugal*

➢ Posters:

***Mathilde Lacroix,** Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy. PK/PD modelling of the CAMHB nutrients concentrations effect on polymyxin B antimicrobial activity against A. baumannii -- 33rd International ECCMID congress April 2023 Copenhagen, Denmark*

***Mathilde Lacroix,** Alexia Chauzy, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hélène Mirfendereski, Hamasseh Shirvani, Julien Buyck, Sandrine Marchand, William Couet. In vitro PK/PD modelling of polymyxin B against resistant strain of A. baumannii in presence of mucin – 32nd International ECCMID congress April 2022 Lisbon, Portugal*

*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, July 2021.*

*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, June 2021.*

Liste des abréviations

°C	Degré celsius
A. baumannii	*Acinetobacter baumannii*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
AR	Adaptative Resistance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
AUC	Aire sous la courbe
C	Concentration
Ca^{2+}	Ion calcium
CAMHB	Bouillon Mueller Hinton ajusté en cations
CI	Interval de confiance
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cmax	Concentration maximum
CMB - MBC	Concentration Minimale Bactéricide
CMI - MIC	Concentration minimale inhibitrice
COG	Clusters orthologues
E. coli	*Escherichia coli*
e.g.	*exempli gratia*
EC_{50}	Concentration nécéssaire pour obtenir 50% de l'Emax
ELF	Fluide de revêtement épithélial
EMA	European Medicines Agency
Emax	Effet maximum
Eq.	Equation
et al.	*et alius*
etc.	et cetera
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ex:	par exemple
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	Figure
h	Heure
HFIM	Hollow-fiber Infection Model
HGT	Transfert de gène horizontal
i.e.	*id est*
IE	Inoculum effect
IK-HL	initial killing half-lives
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
K_{net}	Constante de croissance
LCR	Liquide céphalo-rachidien
log	Logarithme de base 10
LOS	Lipooligosaccharides
LPS	Lipopolysaccharides

mg/kg	Milligramme par kilo
mg/L	Milligramme par litre
Mg^{2+}	Ion magnésium
MO	Membrane externe
OMS - WHO	Organisation Mondiale de la Santé
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PAP	Profil d'Analyse de Population
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PD	Pharmacodynamie
pH	Potentiel Hydrogène
PK	Pharmacocinétique
PMB	Polymyxine B
R	Sous-population résistante à l'antibiotique
RSE	Relative standard error
RT-dPCR	*Reverse transcription-polymerase chain reaction digital* PCR quantitative Quantitative reverse transcription polymerase chain
RT-qPCR	reaction
S	Sous-population sensible à l'antibiotique
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SIR	*Sampling Importance Resampling procedure*
TK	Time-kill
UFC	Unité formant colonie
UFC/mL	Unité formant colonie par millilitre
VPC	Visual Predictive check

Liste des tables

Table 1: Valeurs de CMI [mg/L] pour différentes dilutions de CAMHB (adaptée de la Table 1 – Article 2) 219
Table 2: Paramètres des modèles PK/PD influencés par la dilution du CAMHB (adaptée de la Table S1 – Article 2)..... 220
Table 3: Valeur de CMI pour différents milieux [mg/L] (Table 2 – Article 3) 224
Table 4 : Paramètres du modèle PBPK..... 254
Table 5 : Paramètres des modèles PD pour l'infection de la cuisse 255
Table 6: Paramètres des modèles PD pour l'infection du poumon 256

Liste des figures

Figure 1: Chronologie montrant les nouvelles classes d'antibiotiques arrivées en clinique. 20
Figure 2: Evolution du nombre de nouveaux antimicrobiens mis sur le marché entre 2000 et 2022 (4) 21
Figure 3: Carte représentant l'évolution de la résistance aux céphalosporines de 3ème génération chez Escherichia coli entre 2010 et 2020 (5) 21
Figure 4: Image de microscopie électronique à balayage (MEB) représentant un groupe de bactéries Acinetobacter baumannii (19) 24
Figure 5: Représentation de la structure générale des LPS et LOS. Les lignes zigzag du lipide A représentent les chaines d'acide gras (21) 25
Figure 6: Proportion des différentes bactéries retrouvées lors des pneumonies nosocomiales (34) .. 26
Figure 7: Pourcentage global de résistance aux carbapénèmes (R%) d'A. baumannii. 28
Figure 8: Représentation chimique de la polymyxine B, avec les différences entre les variants B1, B2, B3 et B1-I (58) 31
Figure 9: Mécanisme d'action de la colistine. 33
Figure 10: Biosynthèse et transport du LOS chez A. baumannii (96) 37
Figure 11: Sensibilité et résistance à la colistine chez E. coli (101) 38
Figure 12: Concept de l'approche PK/PD (108) 40
Figure 13: Photo d'une détermination de la CMI par la méthode de gradient (110) 41
Figure 14: Protocole de préparation pour l'évaluation de la CMI et CMB (113) 42
Figure 15: Définition des indices PK/PD (120) 43
Figure 16: Protocole de préparation d'expérience de TK, créé avec BioRender.com 44
Figure 17: Représentation du système à un compartiment (122) 45
Figure 18: Représentation du système à deux compartiments (123) 46
Figure 19: Représentation graphique d'un modèle PK/PD comprenant un compartiment bactérien B. 47
Figure 20: Représentation graphique d'un modèle PK comprenant un compartiment C représentant l'antibiotique 47
Figure 21: Représentation graphique d'un modèle PK/PD 48
Figure 22: Représentation graphique d'un modèle PK/PD avec hétéro-résistance 49
Figure 23: Représentation graphique d'un modèle PK/PD d'adaptation 50

Figure 24: Résultat de puce à ADN décrivant les pourcentages de sur (vert) et sous-expression des clusters orthologues (COG) d'A. baumannii en condition limitée en fer (196)..... 55
Figure 25: Représentation des étapes de formation d'un biofilm (291) 62
Figure 26: Représentation d'un biofilm avec les différents facteurs influençant l'activité des antibiotiques (298) 63
Figure 27: Représentation schématique du modèle PK/PD de Sou et al..... 64
Figure 28: Schéma du modèle PKPD utilisé par Nielsen et al. pour la caractérisation de l'effet inoculum d'E. coli sur l'activité in vitro de la ciprofloxacine (339)..... 67
Figure 29: Démarche scientifique suivie durant cette thèse 69
Figure 30: Simulation de la variation des UFC avec le temps pour différentes concentrations de PMB, en fonction de la taille de l'inoculum. 218
Figure 31: Visual Predictive Check (VPC) des modèles de l'article 2 pour le CAMHB-100% et 10% et différentes concentrations de PMB. 220
Figure 32: Simulations pour ATCC 19606 de l'évolution des valeurs d'UFC en fonction du temps pour différentes concentrations de PMB. 221
Figure 33: Simulations pour AB122-D12 de l'évolution des valeurs d'UFC en fonction du temps pour différentes concentrations de PMB. 222
Figure 34: Visual Predictive Check (VPC) des modèles de l'article 3 pour AB121-D0 et AB122-D12. 225
Figure 35: Représentation graphique des modèles PK/PD avec hétéro-résistance (à gauche) et adaptation (à droite). 226
Figure 36: Visual Predictive Check (VPC) des données de TK pour différentes concentrations de PMB. 227
Figure 37: Evolution dans le temps de la proportion des bactéries dans les modèles S/R et d'adaptation. 228
Figure 38: Représentation des profils de courbes de TK obtenues lors de TK séquentielles, pour le choix de la structure des modèles PD..... 229
Figure 39: Visual Predictive Check (VPC) des données de TK. 231
Figure 40: Cartes thermiques des expressions géniques. 232
Figure 41: Images obtenues au microscope confocale. 233
Figure 42: Représentation schématique du modèle de Tait et al. basé sur des expérience en HFIM avec du ceftolozane/tazobactam (C/T) contre P. aeruginosa et incluant les structures S/R et d'adaptation (130). 235
Figure 43: Représentation du modèle PBPK 236
Figure 44: Simulations réalisées avec le modèle PBPK des concentrations de PMB totales dans le plasma, le poumon et le muscle..... 238

Figure 45: Nombre de bactéries dans le muscle et le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB. 239
Figure 46: Simulations réalisées avec le modèle PBPK des concentrations de PMB totales dans le muscle (bleu) et le poumon (vert). 240
Figure 47: Représentation schématique de la distribution extravasculaire des principes actifs, montrant qu'à l'équilibre, la concentration libre (Cu) est identique dans le compartiment vasculaire et extravasculaire (377) 241
Figure 48: Simulations des concentrations de PMB totale (trait plein) et libre (pointillé) dans le plasma. Simulations réalisées avec le modèle PK développé par Chauzy et al. (154)..... 242
Figure 49: Nombre de bactéries dans le muscle et le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB. 243
Figure 50: Nombre de bactéries dans le muscle (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB. 244
Figure 51: Nombre de bactéries dans le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB. 245
Figure 52: Nombre de bactéries (UFC/cuisse) en fonction du temps pour différents inocula 246
Figure 53: Représentation des modèles PK/PD utilisé pour décrire l'effet inoculum in vitro (A) (340) et in vivo (154). 247
Figure 54: Evolution du nombre de bactéries au cours du temps chez des souris infectées dans la cuisse et dans les poumons avec A. baumannii AB121-D0. 255

INTRODUCTION

Chapitre 1

Le développement des antibiotiques et l'antibiorésistance

Les antibiotiques sont des médicaments prescrits dans le cas d'infection, de par leur capacité à inhiber la croissance ou à éliminer les bactéries. En 1910, Paul Ehrlich mit au point une molécule efficace et mieux tolérée que les sels de mercure ou l'iodure de potassium : le Salvarsan, qui deviendra le traitement antisyphilitique de référence jusqu'à l'avènement de la pénicilline (Figure 1). Gerhard Domagk développa par la suite en 1935, le Prontosil premier sulfamide, qui permettra le développement de cette classe d'antibiotique. En 1939, le premier antibiotique naturel fut isolé par René Dubos : la gramicidine, pour traiter les infections à bactéries Gram positifs. Auparavant, d'anciennes préparations contenant des moisissures destinées à soigner les plaies infectées étaient déjà connues et utilisées en Chine et en Grèce. C'est en 1940 qu'Howard Florey et Ernst Boris Chain réussirent à isoler la substance découverte par Alexander Fleming en 1927 : la pénicilline, mais seulement en très petite quantité. Les essais chez la souris et l'humain étaient concluants mais les faibles capacités de production freinaient son usage (1). Alors que l'Europe est en guerre, Howard Florey se tourna alors vers les États-Unis, où en 1941, les laboratoires Pfizer utilisèrent leurs connaissances de fermentation en cuves pour produire cette molécule en quantité industrielle (2). La pénicilline sera alors largement utilisée pendant la guerre pour soigner les milliers de soldats blessés et deviendra rapidement l'antibiotique de référence. La recherche ainsi que la commercialisation des antibiotiques connaîtront alors un âge d'or à partir des années 1950 avec la découverte d'autres classes comme les aminoglycosides ou les quinolones. Cependant, avec la complexification de la législation et l'augmentation des coûts de recherche, le développement de nouveaux antibiotiques fut considérablement ralenti à partir des années 1970 (3).

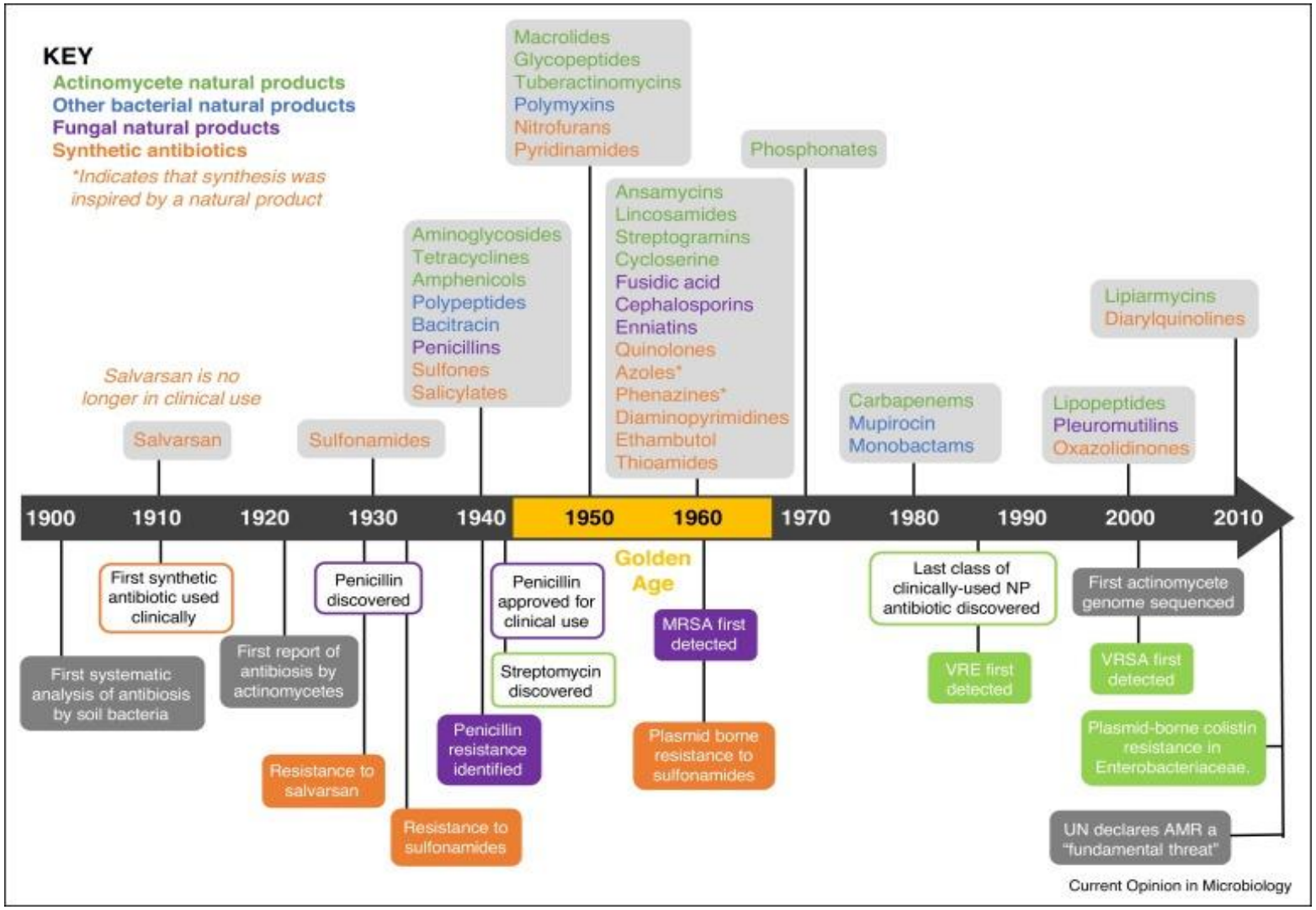


Figure 1: *Chronologie montrant les nouvelles classes d'antibiotiques arrivées en clinique.*
Les antibiotiques sont colorés selon leur origine : vert = actinomycètes, bleu = autres bactéries, violet = champignons et orange = synthétique (3).

Bien que connue depuis les premières utilisations d'antibiotiques, la résistance des bactéries à ces composés était jusqu'alors compensée par l'arrivée de nouvelles molécules sur le marché et notamment de nouvelles classes. Mais du fait de la diminution des nouvelles commercialisations (Figures 1 et 2), associée à une utilisation abusive des composés déjà connus, notamment en médecine vétérinaire ; la résistance aux antibiotiques a continué d'augmenter (Figure 3), entraînant alors une augmentation des échecs thérapeutiques.

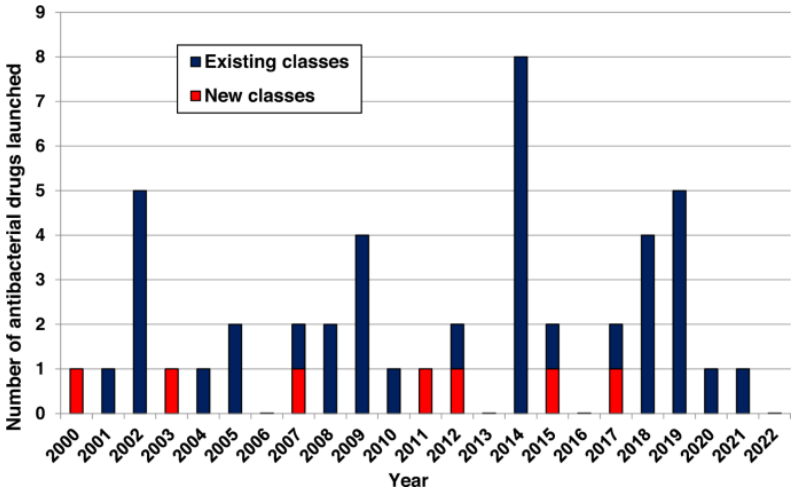


Figure 2: *Evolution du nombre de nouveaux antimicrobiens mis sur le marché entre 2000 et 2022 (4)*

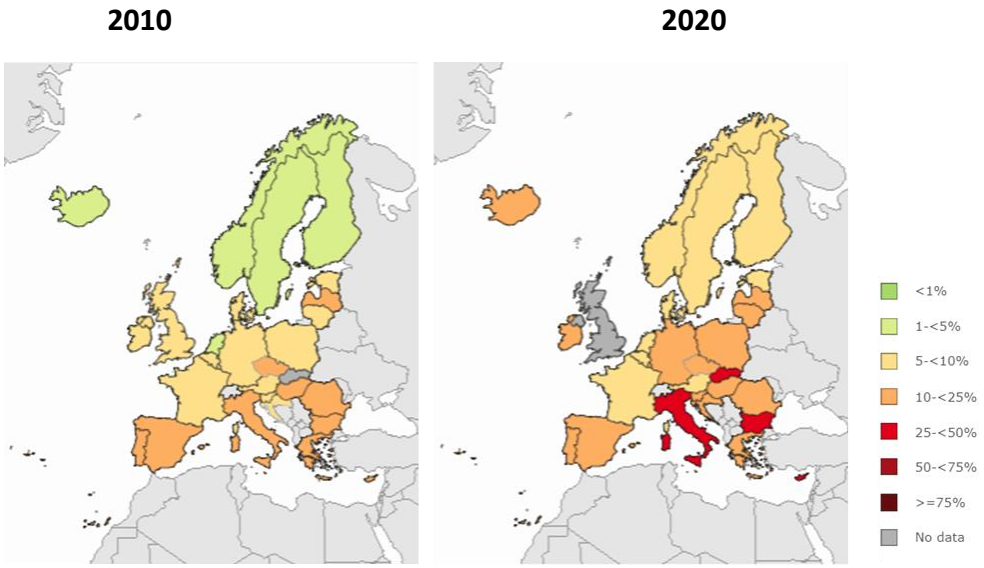


Figure 3: *Carte représentant l'évolution de la résistance aux céphalosporines de 3ème génération chez Escherichia coli entre 2010 et 2020 (5)*

La résistance aux antibiotiques représente de nos jours une menace sérieuse et grandissante pour la santé humaine et vétérinaire, et ce dans le monde entier. La gestion de cette dernière a besoin d'être coordonnée au niveau mondial en prenant en compte tous ces acteurs (approche *One Health*). Ces dernières années, des politiques de santé publique pour limiter le mésusage de ces molécules ont été mises en place. Toutefois, ces dernières doivent être étendues et appliquées en particulier dans les pays en développement ; où le mésusage des antibiotiques peut favoriser l'émergence de résistances qui pourront se disséminer dans le reste du monde.

La recherche de nouvelles molécules ainsi que l'optimisation de celles déjà sur le marché sont promus par le financement de projets publics et/ou privés via différentes organisations nationales ou internationales telles que l'ANR (Agence Nationale de la Recherche), le JPIAMR (*Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance*), ou encore BARDA (*Biomedical Advanced Research and Development Authority*). Par ailleurs, l'incitation à la recherche passe également par une meilleure reconnaissance financière des antibiotiques. Un nouveau modèle de financement de ces derniers, proportionnel à leur utilité publique, doit être repensé en accord avec les Etats, les institutions et les industries. Ceci afin de ne pas répéter l'histoire d'Achaogen qui en 2018 sortit sur le marché un nouvel antibiotique (Zemdri) contre les *Enterobacteriaceae* multi-résistantes mais qui n'a pas pu amortir les coûts de développement de ce nouveau médicament, ce qui a entraîné sa faillite en 2019 (6).

La mise en place de solutions contre le développement des résistances est un processus qui doit promptement donner des résultats, car si l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes en thérapeutique est un phénomène connu depuis les années 1990, des événements exceptionnels tels que la pandémie de COVID-19 (SARS-CoV-2) peuvent accélérer cette tendance. En effet, le COVID-19 a induit une augmentation des hospitalisations et des traitements antibiotiques partout dans le monde, et a promu l'apparition et la dispersion de résistance (7). Pendant la pandémie, la prévalence des co-infections bactériennes était de 5,3 % et la prévalence des infections bactériennes secondaires de 18,4 %, la proportion d'infections résistantes aux antimicrobiens était de 60,8 % (8), compliquant davantage une situation déjà difficile. Parmi les souches résistantes, les plus signalées étaient : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter baumannii* résistant aux carbapénèmes (9).

Chapitre 2

Acinetobacter baumannii

1. HISTORIQUE

Acinetobacter baumannii est une bactérie, découverte en 1911 par Martinus Beijerinck qui identifia l'espèce *Micrococcus calco-aceticus* à partir d'échantillons de sols (10). Dans les années qui suivirent, des microorganismes similaires ont été décrits incluant le genre Achromobacter (11). En 1954, Jean Brisou et André-Romain Prévot différencièrent les microorganismes mobiles du genre Achromobacter (12), et c'est en 1968 que le genre Acinetobacter est finalement adopté suite à l'étude de Baumann *et al.* (13). En 1986, Bouvet et Grimont ont classifié, grâce à la technique d'hybridation de l'ADN, différentes espèces au sein du genre Acinetobacter incluant *A. baumannii, A. calcoaceticus, A. haemolyticus, A. johnsonii, A. junii, and A. lwoffii* (14).

2. CARACTÉRISTIQUES

A. baumannii est un coccobacille Gram négatif de 1.0–1.5 µm par 1.5–2.5 µm (Figure 4). Si *A. baumannii* est souvent de forme coccoïde pendant les phases de croissance rapide, cette bactérie se présente par paire ou en chaîne de longueurs variables pendant les phases stationnaires (15). Ne fermentant pas le glucose, elle est catalase et citrate positive mais oxydase négative. Non mobile, elle ne possède pas de flagelle mais, des pili qui participent notamment à la formation de biofilm et à sa virulence.

Strictement aérobie, le genre Acinetobacter est omniprésent dans la nature en particulier dans les échantillons de sol, dans les eaux usées, sur les végétaux, chez l'humain, les animaux ou les parasites notamment les poux (16, 17, 15). *A. baumannii* est une espèce robuste qui peut survivre dans des milieux humides mais aussi à des conditions de dessiccation importantes avec un accès limité en nutriments. Ceci facilite notamment sa persistance et transmission dans l'environnement naturel et médical. Elle a d'ailleurs été retrouvée dans des sols pollués en hydrocarbures, et a montré être capable de dégrader le diesel (18). Cette espèce se cultive facilement dans les milieux classiques de laboratoire tels que le bouillon Mueller-Hinton ou le sang.

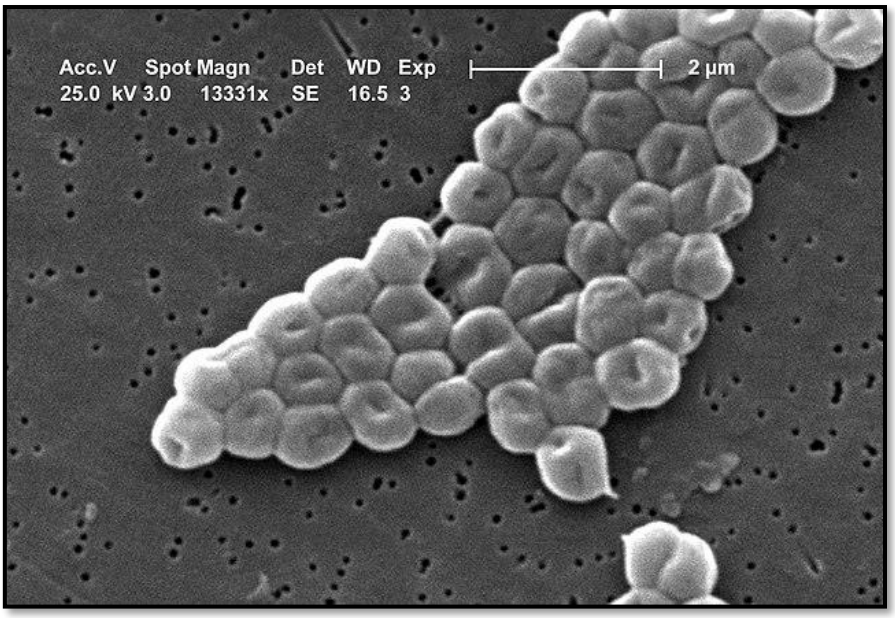


Figure 4: *Image de microscopie électronique à balayage (MEB) représentant un groupe de bactéries Acinetobacter baumannii (19)*

Sa membrane présente deux couches lipidiques et une couche intercalée de peptidoglycanes, typique des bactéries à Gram négatif, cependant lors des tests de coloration de Gram, la teinte peut persister et engendrer sa classification erronée en tant que bactérie à Gram positif. Les lipopolysaccharides (LPS) sont le principal composant du feuillet externe de la membrane externe (MO) de nombreuses bactéries Gram négatif. Ils établissent une barrière qui protège la cellule contre l'entrée de molécules toxiques telles que les antibiotiques (20), de plus ils jouent un rôle majeur dans la pathogénicité bactérienne car c'est l'une des principales molécules reconnues par le système immunitaire. Le LPS est composé d'un lipide endotoxique

A, d'un noyau d'oligosaccharides et d'une structure de sucres répétés appelée antigène O (21). Les sous-unités répétées de l'antigène O sont ligaturées au lipide A par l'enzyme *WaaL* ligase. Cependant *A. baumannii*, ne possède pas d'orthologue de la *WaaL* ligase, et n'élabore ainsi que des lipooligosaccharides (LOS) composés du lipide A et du noyau oligosaccharidique (Figure 5) (22).

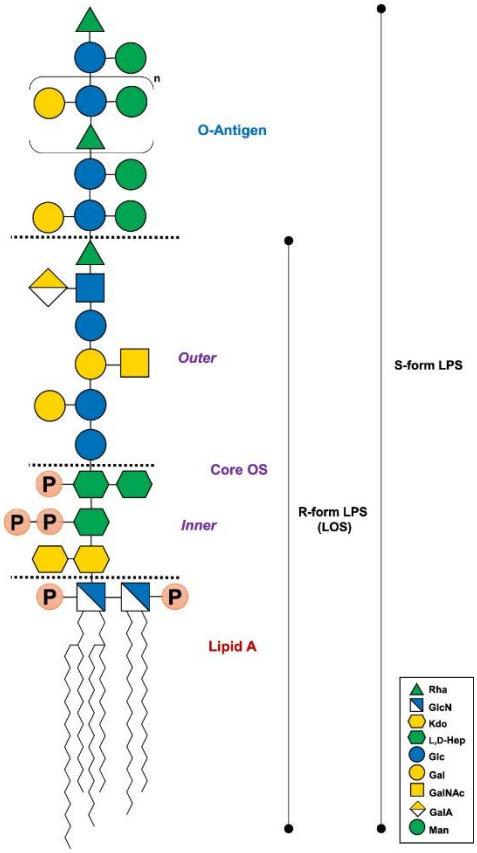


Figure 5: *Représentation de la structure générale des LPS et LOS. Les lignes zigzag du lipide A représentent les chaines d'acide gras (21)*

Abréviations: Rha, 6-deoxy-mannose (rhamnose); GlcN, 2-amino-2-deoxy-glucose (glucosamine); Kdo, 3-deoxy-α-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid; L,D-Hep, L-glycero-D-manno-heptose; Glc, glucose; Gal, galactose; GalNAc, 2-acetamido-2-deoxy-galactose (N-acetylgalactosamine); GalA, galacturonic acid; Man, mannose; P, phosphate.

3. EPIDÉMIOLOGIE

A. baumannii est un pathogène opportuniste qui cible principalement les muqueuses et les zones où la barrière anatomique est altérée comme à l'emplacement d'un cathéter, d'une sonde endo-trachéale, ou lors de chirurgie ; qui permettent une voie d'entrée de la bactérie dans l'organisme. Il peut induire différents types d'infection comme des pneumonies, des bactériémies, des méningites, des infections cutanées ou des voies urinaires. En temps normal, *A. baumannii* est rarement commensale du microbiote de la peau avec une

prévalence inférieur à 3 % (23, 24), une prévalence qui augmente cependant chez les personnes sans-abris (10.8 %) (25). Par ailleurs bien que transitoire, le taux de portage manuel chez les professionnels de santé varie de 3 % à 23 % (26, 27). Une des principales populations à risque concernant les infections avec cette espèce sont les soldats déployés en zone de conflit, du fait du développement de la bactérie dans les installations de traitement militaire, favorisé par le sable et la sécheresse. *A. baumannii* est d'ailleurs la principale source d'infection des soldats blessés (28). Une émergence des infections a d'ailleurs été observée pendant les guerres d'Irak et d'Afghanistan (29, 30). En dehors du système militaire, *A. baumannii* est responsable d'infections nosocomiales en particulier chez les patients immunodéprimés (31). Comme elle peut supporter des conditions de dessiccation pendant de longues périodes, *A. baumannii* est fréquemment isolée des équipements médicaux réutilisables tels que les tubes de ventilation, les appareils de surveillance de la pression artérielle, les humidificateurs, les lavabos, les urinoirs ou les respiromètres. La présence de cette bactérie dans les établissements de santé pose de réels problèmes, en particulier pour les patients les plus fragiles dont les séjours hospitaliers sont prolongés notamment dans les unités de soins intensifs.

Les pneumonies nosocomiales sont des infections pulmonaires qui se développent suite à une ventilation mécanique des patients, notamment du fait de la formation de biofilm à la surface des sondes endo-trachéales en particulier chez les personnes en réanimation ou soins intensifs. Ces pneumonies sont le deuxième type d'infection nosocomiale le plus fréquent, représentant jusqu'à 40% des cas (32). Les principaux micro-organismes responsables de ces infections sont *P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae, S. aureus* et *A. baumannii* qui est détecté dans ~36% des infections (33) (Figure 6).

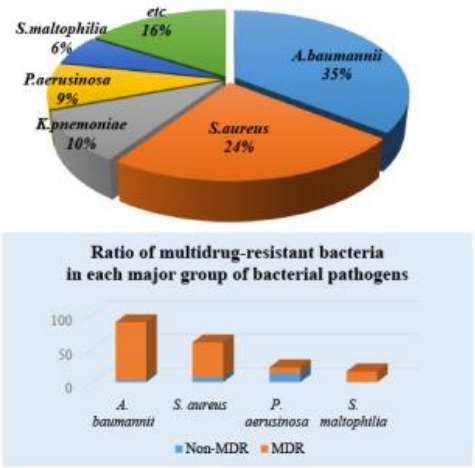


Figure 6: *Proportion des différentes bactéries retrouvées lors des pneumonies nosocomiales (34)*

Le taux de mortalité chez les patients gravement malades est plus élevé chez ceux qui présentent ces pneumonies, bien que ces taux restent controversés, du fait de l'incertitude associée à leurs causes de décès qui sont souvent plurifactorielles (32). Les pneumonies nosocomiales sont en revanche toujours associées à une dégradation de l'état du patient et une prolongation des soins, en particulier pour *A. baumannii* qui est une cause de mauvais pronostic associé à un taux de mortalité plus élevé (34).

Pendant l'épidémie de Covid-19, une augmentation de la prévalence des infections à *A. baumannii* a été rapportée dans le monde (35–39). Dans une étude réalisée en Turquie entre le 1er janvier 2018 et le 30 juin 2022, incluant tous les patients infectés par *A. baumannii* en unité de soins intensifs, 27 mois avant et 27 mois pendant la pandémie, le taux d'infection à *A. baumannii* pendant la pandémie était 1,90 fois plus élevé (OR : 1,90, IC à 95 % : [1,197, 3,033]) par rapport à l'ère pré-pandémique, sans changement significatif du taux de mortalité (38). La prévalence et le taux de mortalité associés à *A. baumannii* pendant l'épidémie de Covid-19 varient de manière importante entre les études, mais elles s'accordent cependant sur l'augmentation de ces infections qui, sans mesures spécifiques, pourraient entraîner des épidémies nosocomiales persistantes et la dispersion de résistance.

4. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE

Une des particularités de la bactérie *A. baumannii* est sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance via des mutations, des plasmides, des transposons ou des intégrons ; par transfert horizontal de gènes (HGT) ou transformation naturelle (40). Cette espèce est naturellement résistante aux pénicillines, aux céphalosporines de première et deuxième génération, au chloramphénicol et à la fosfomycine, mais elle peut acquérir des mécanismes de résistance conduisant à la production d'enzymes dégradant les β-lactamines, à des modifications d'enzyme contre les aminoglycosides (41), à une altération des sites de fixation pour les quinolones, à une modification des protéines membranaires qui empêche l'action des polymyxines ou à la présence de systèmes d'efflux (42). La combinaison de ces mécanismes engendre le développement de bactéries résistantes à de multiples antibiotiques pour lesquels les possibilités de traitement efficace s'amenuisent. Ces dernières années au Japon,

au Canada, en Océanie, dans l'Europe du Nord, de l'Est et pour une partie de l'Europe centrale, la distribution de *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes reste modeste (<10 %) (Figure 7). Cependant, aux USA, en Asie, dans le sud de l'Europe, au Moyen-Orient, ou dans le nord de l'Afrique, les souches résistantes représentent jusqu'à 90 % des bactéries isolées (43). Dans le monde, le taux moyen de mortalité des pneumonies nosocomiales avec *A. baumannii* résistant aux carbapénèmes est estimé à plus de 40 % malgré d'importantes disparités entre les pays (44, 45). En 2017, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a listé les *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes comme étant une priorité absolue, pour laquelle le besoin de nouveaux traitements est urgemment nécessaire (46).

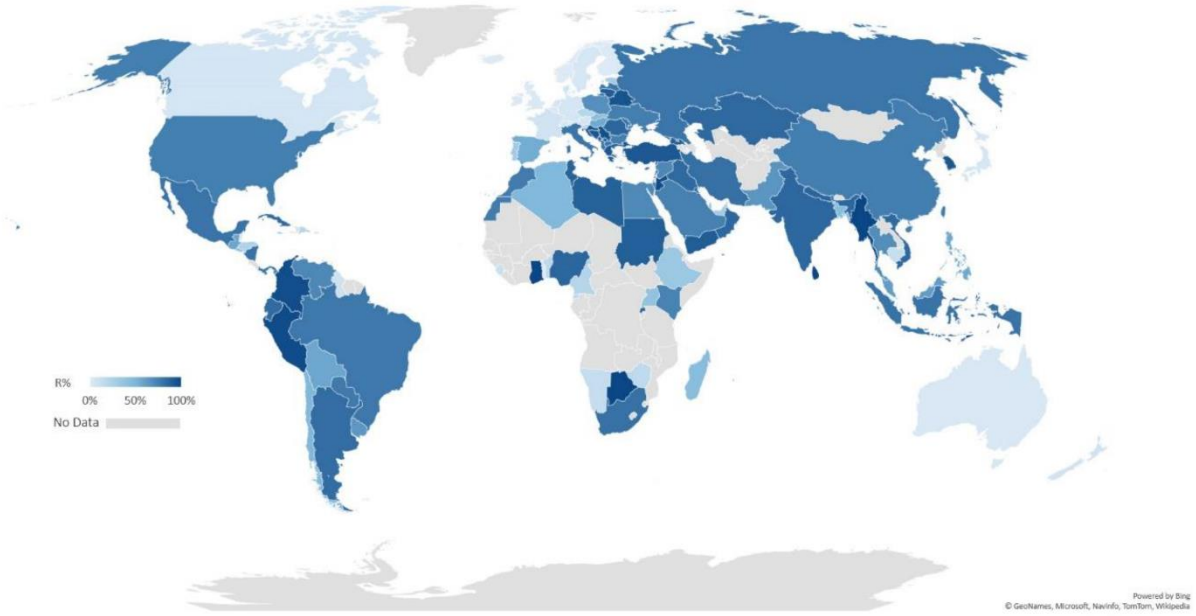


Figure 7: *Pourcentage global de résistance aux carbapénèmes (R%) d'A. baumannii.*
La nuance de bleu représente le niveau de résistance aux carbapénèmes dans le monde entre 2009 et 2018 (43).

5. FACTEURS DE VIRULENCE

A. baumannii n'est pas considérée comme une bactérie très virulente, néanmoins elle possède quelques facteurs qui favorisent les infections. La présence de pili et la production de facteurs d'adhérence permettent notamment la formation de biofilm (47). Par ailleurs, l'hydrophobicité de sa surface lui permet de limiter sa phagocytose. Plusieurs porines ont également été identifiées comme celles de la famille d'OmpA, connue pour leurs rôles dans la

formation des biofilms, dans la modulation de la réponse immunitaire et dans l'antibiorésistance (48). L'excrétion des lipooligosaccharides (LOS) de sa membrane, de même que certaines cytokines, ou des estérases ont montré un rôle pro-inflammatoire qui peut endommager les tissus (16).

6. TRAITEMENT

De nos jours, les infections à Acinetobacter se répandent rapidement à travers le monde en particulier dans les unités de soins intensifs. Les praticiens disposent de plusieurs options pour traiter les infections induites par des souches sensibles. Les traitements de première intention peuvent être les céphalosporines à large spectre (ceftazidime ou céfépime), la pipéracilline-tazobactam, les carbapénèmes (ex : méropénème ou imipénème-cilastatine) et les fluoroquinolones (ex : ciprofloxacine). Les aminoglycosides sont également des solutions thérapeutiques pour les infections des voies urinaires (49).

En ce qui concerne les isolats résistants aux antibiotiques de première intention en particulier pour les *A. baumannii* résistants aux carbapénèmes (CRAB), l'ampicilline-sulbactam à forte dose est utilisé en premier choix. Les polymyxines ou la tigécycline à forte dose sont également possibles. En cas d'infections graves, les combinaisons d'antibiotiques dits de deuxième intention sont favorisées. La référence est l'ampicilline-sulbactam à forte dose, si possible en association avec les polymyxines, les aminosides, ou la tigécycline (si CMI <8 mg/l). Le céfidérocole n'est utilisé qu'en l'absence d'autre alternative et en association (50).

La lutte contre *A. baumannii* doit être privilégiée en amont des infections, car peu de solutions thérapeutiques sont disponibles pour des bactéries qui deviennent de plus en plus résistantes. Une attention particulière doit être apportée au processus de désinfection des unités de soins pour limiter les réservoirs et leurs dispersions et minimiser le développement de résistance.

Chapitre 3

La polymyxine B

1. HISTORIQUE

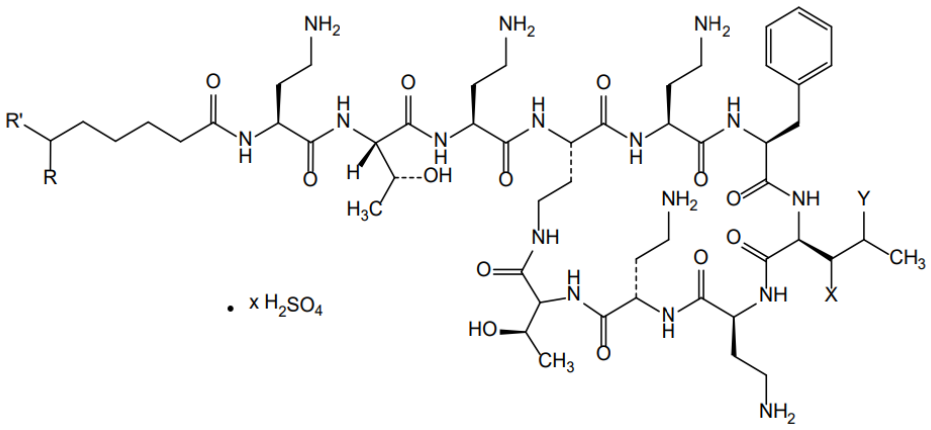
Les polymyxines sont des molécules produites par la bactérie *Paenibacillus polymyxa,* et ont été découvertes en 1947. Etant synthétisées par des synthétases non-ribosomiques, ces molécules sont référencées comme peptides non-ribosomiques. De nos jours, plus d'une vingtaine de molécules de polymyxine ont été recensées (28) incluant les polymyxines B et E (autrement appelée colistine), qui sont toutes deux approuvées et utilisées en clinique pour le traitement des infections à bactéries Gram négatif depuis les années 1950. A partir des années 1970, du fait des problèmes de toxicité rénale, les polymyxines sont de moins en moins prescrites en médecine humaine mais restent toujours utilisées en médecine vétérinaire et comme facteur de croissance (51–53). Ces utilisations ont engendré le développement et la dissémination de gènes de résistance (ex : plasmide contenant le gène mcr-1) via la chaîne alimentaire (54). Plusieurs pays ont alors interdit ou restreint leur utilisation en tant qu'additif alimentaire (55).

Du fait de l'augmentation de la prévalence des bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes et de l'optimisation de la prévention des effets indésirables, les polymyxines sont de nouveau utilisées, notamment en traitement de dernier recours pour les bactéries présentant des résistances aux antibiotiques de première intention comme les β-lactamines, les aminoglycosides ou les fluoroquinolones.

2. PROPRIÉTÉ PHYSICO-CHIMIQUE

La polymyxine B est un antibiotique cationique, du fait de la présence de 5 groupes amines lui conférant 5 charges positives à pH physiologique (56) (Figure 8). Elle est formée d'un macrocycle et d'une chaîne peptidique avec une queue d'acides gras. La polymyxine E (colistine) est un mélange de décapeptides, les polymyxines E1 (colistine A) et E2 (colistine B) avec une masse moléculaire d'environ 1 160 g/mol, et la polymyxine B est un mélange de 4 molécules : PB1, PB2, PB3 et PB1-I de poids moléculaires d'environ 1 200 g/mol. Les proportions de ces dernières dépendent des lots et des fabricants, mais la PB1 et PB2 restent les composants majoritaires et représentent environ 80 % de la polymyxine B totale. La polymyxine B diffère de la colistine par un remplacement d'une D-Leucine par une D-phénylalanine dans le macrocycle.

Bien que le macrocycle confère une nature hydrophile aux polymyxines, la queue d'acides gras est hydrophobe. Cette double propriété permet l'action détergente de ces molécules sur les membranes bactériennes (57).



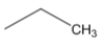
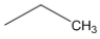
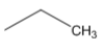
Polymyxin	R	R'	X	Y	Mol. Formula	Mol. Wt.
B1					$C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$	1203.48
B2					$C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$	1189.45
B3					$C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$	1189.45
B1-I					$C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$	1203.48

Figure 8: *Représentation chimique de la polymyxine B, avec les différences entre les variants B1, B2, B3 et B1-I (58)*

3. MÉCANISME D'ACTION

En ciblant les LPS ou LOS à la surface des membranes, les polymyxines montrent une action limitée sur les bactéries à Gram positif en raison de leurs épaisses couches de peptidoglycanes. Par leur structure, les polymyxines induisent la mort des cellules via une déstabilisation de l'intégrité des membranes, entrainant une perméabilisation des cellules. Ce mécanisme joue également un rôle dans la toxicité de ces composés pour les cellules humaines. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce mécanisme et l'activité bactéricide de ces molécules.

3.1. Lyse des membranes

La capacité des polymyxines à s'intercaler entre les LPS ou LOS des membranes bactériennes entrainant leur déstabilisation et un changement dans la balance osmotique de la cellule, est l'un des principaux mécanismes d'action (59).

Les connaissances actuelles montrent que la région cationique des polymyxines se lie par des liaisons électrostatiques aux LPS/LOS négativement chargés sur la membrane externe des bactéries (Figure 9). La queue hydrophobe de la molécule interagit alors avec le lipide A du LPS/LOS en se fixant aux résidus phosphates. Les polymyxines déplacent alors les ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}) qui forment des ponts entre les lipides A adjacents et stabilisent la membrane. En déplaçant les cations, les polymyxines fragilisent la membrane et permettent l'entrée dans la cellule de molécules auparavant non-pénétrantes, engendrant la fuite de protéines plasmatiques et modifiant la balance osmotique (60–64). Toutefois, l'action des polymyxines sur la membrane interne ne fait pas consensus. A ce jour, l'hypothèse principale serait que les polymyxines agissent de manière analogue avec une liaison aux LPS/LOS se trouvant sur la membrane interne, induisant une déstabilisation de celle-ci et la mort cellulaire.

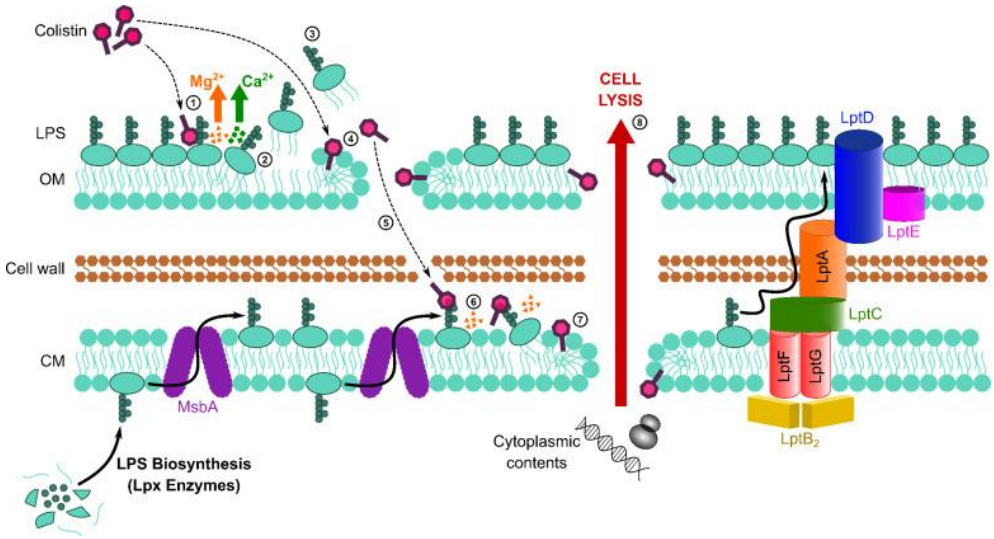


Figure 9: *Mécanisme d'action de la colistine.*
OM : Membrane externe (Outer Membrane), CM : Membrane Cytoplasmique (65)

Bien que considérée comme action principale des polymyxines sur les bactéries, il a été montré chez *P. aeruginosa* et *E. coli* traitées avec des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), que l'augmentation de la mort cellulaire n'était pas proportionnelle à la quantité de membranes perturbées (66, 67), suggérant l'existence de mécanismes d'actions alternatifs.

3.2. Inhibition de la respiration bactérienne

Des études ont montré que les polymyxines inhibaient la respiration cellulaire en déstabilisant les membranes. En effet, l'intégrité des membranes est nécessaire à l'action de la respiration aérobie des bactéries qui fonctionne par des transferts d'électrons à la membrane via la phosphorylation oxydative. De plus, les polymyxines inhibent la NADH oxydase et l'enzyme NADH réductase du cytochrome C impliquées dans la respiration aérobie des bactéries (68, 69). Bien que n'induisant pas spécifiquement la mort des cellules, ce mécanisme participe à l'affaiblissement énergétique de ces dernières.

3.3. Production de radicaux libre d'oxygène

Il a été montré que les polymyxines pouvaient induire la production de radicaux libres d'oxygène (ROS) comme les ions superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou des radicaux hydroxyles ($^{\bullet}OH$) (70, 71). Ces éléments peuvent conduire à des dommages oxydatifs des composants cellulaires comme les protéines, les lipides, ou l'ADN et peuvent engendrer la mort cellulaire. Cependant, ce mécanisme n'est pas encore entièrement accepté du fait de l'observation d'activité antimicrobienne des polymyxines indépendantes des ROS (72).

3.4. Action sur la division cellulaire

Des études ont montré que bien que n'induisant pas la mort des cellules, des concentrations sublétales de colistine réduiraient le nombre de division cellulaire de *P. aeruginosa* par une augmentation de la rigidité des cellules (73). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant ce phénomène, comme par exemple la fixation des polymyxines à différents éléments nécessaire à la division cellulaire (74). Ce mécanisme d'action nécessite d'être davantage étudié pour comprendre plus en détail son importance dans l'action des polymyxines.

3.5. Liaison aux ribosomes

L'interaction entre les polymyxines et les ribosomes a été démontrée suite à l'induction de la précipitation de ces derniers chez *E. coli* par la présence de polymyxine (75–77). Néanmoins, le rôle de ce mécanisme dans l'action des polymyxines n'est pas entièrement élucidé et davantage de recherches sont nécessaires pour comprendre l'action de ces antibiotiques sur la synthèse protéique.

Si l'action des polymyxines dépend principalement de leur interaction avec les membranes bactériennes et de leurs perturbations, d'autres mécanismes secondaires jouent certainement un rôle dans leur action antimicrobienne, toutefois des études supplémentaires sont nécessaires pour les élucider pleinement.

4. UTILISATION EN CLINIQUE

Les polymyxines B et E ont des actions antimicrobiennes similaires contre les bactéries *Enterobacteriaceae* et sont particulièrement utilisées en traitement de dernier recours pour les infections causées par des pathogènes résistants à différentes classes d'antibiotique comme : *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (78).

Les problèmes de toxicité rénale observés dès les années 1960 (79–81), sont dus à une accumulation de la molécule dans les tubulaires rénaux entrainant une nécrose de ceux-ci et une défaillance de l'organe. Une accumulation de la molécule a également été observée dans les tissus cérébraux (82, 83). Les problèmes de toxicité cérébrale sont associés à la fixation des polymyxines aux neurones, bloquant la sécrétion d'acétylcholine, la transmission neuronale, et empêchant l'activité musculaire. Ces effets neurotoxiques sont dose-dépendants et apparaissent diminués ou réversibles lors de l'arrêt des traitements.

Une meilleure connaissance des propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique de ces molécules associée à une optimisation des posologies, montrent une diminution de la fréquence et de la sévérité de ces problèmes de toxicité rénale (84). La polymyxine B apparaît par ailleurs moins toxique que la colistine (85).

Les polymyxines sont administrées par voie parentérale (ex : sous cutanée, intramusculaire et intraveineuse, intrathécale) pour le traitement des infections pulmonaires (*e.g.* la mucoviscidose ou les pneumonies), des bactériémies et des infections urinaires, et pour les traitements des infections du système nerveux central. Elles sont également administrées par nébulisation pour le traitement des affections pulmonaires telles que les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO ou COPD); et pour un usage topique en ophtalmologie sous forme de collyre. Les polymyxines ont une faible biodisponibilité et sont donc rarement utilisées par voie orale, exceptée pour une action antimicrobienne locale dans le système digestif.

Des études ont par ailleurs révélé que chez les patients infectés avec des pathogènes multi-résistants, l'utilisation de colistine nébulisée associée à de la colistine en intraveineuse (IV) apportait de meilleurs résultats par rapport à une injection en intraveineuse seule (86, 87).

Contrairement à la colistine, distribuée dans le monde entier sous la forme de colistiméthate sodique (CMS), l'utilisation de la polymyxine B est beaucoup plus restreinte. Elle n'est disponible que dans certains pays et est principalement utilisée sous forme de polymyxine B sulfate au Brésil, en Malaisie, à Singapour, dans l'État de New York aux États-Unis et dans certaines régions de l'Inde (84).

Les polymyxines ont été classées par l'OMS parmi les « antimicrobiens d'importance critique et hautement prioritaire » (88) et sont à utiliser avec prudence pour préserver leur efficacité et pour minimiser le développement et la dissémination de résistances.

5. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DÉVELOPPÉS PAR A. BAUMANNII VIS-À-VIS DES POLYMYXINES

La résistance aux polymyxines chez *A. baumannii* sont généralement dus à des mutations chromosomiques dont la prévalence est élevée en clinique. Les résistances induites par des plasmides sont davantage retrouvées dans l'environnement notamment chez *E. coli*, notamment du fait de l'usage des polymyxines en médecine vétérinaire (89). Les principaux mécanismes sont les suivant :

5.1. Perte des LOS

Un des mécanismes de résistance de Acinetobacter est la perte de lipooligosaccharides (LOS) à la surface de sa membrane. En effet, des souches comprenant des mutations ou une insertion de transposon dans les gènes impliqués dans la synthèse du lipide A (*lpxA*, *lpxC*, or *lpxD*), inhibant alors sa synthèse et celle des LOS, ont démontré une résistance aux polymyxines (Figure 10).

Les LOS créent une barrière qui empêche les grosses molécules et les composés hydrophobes de pénétrer librement dans la cellule. Les souches montrant une perte de LOS, présentent toujours une membrane externe mais sur laquelle les polymyxines ne peuvent plus se fixer. La membrane externe montre toutefois une intégrité modifiée notamment du fait de sa perméabilité altérée (90). Par ailleurs, cette altération de perméabilité permet souvent de

restaurer la sensibilité à d'autres classes d'antibiotique comme la ceftazidime, les carbapénèmes, la tigécycline, la ciprofloxacine, l'amikacine ou la rifampine, mais aussi à différents désinfectants comme ceux à base de phénol, les ammoniums quaternaires, la chlorhexidine, ou l'éthanol (91–95).

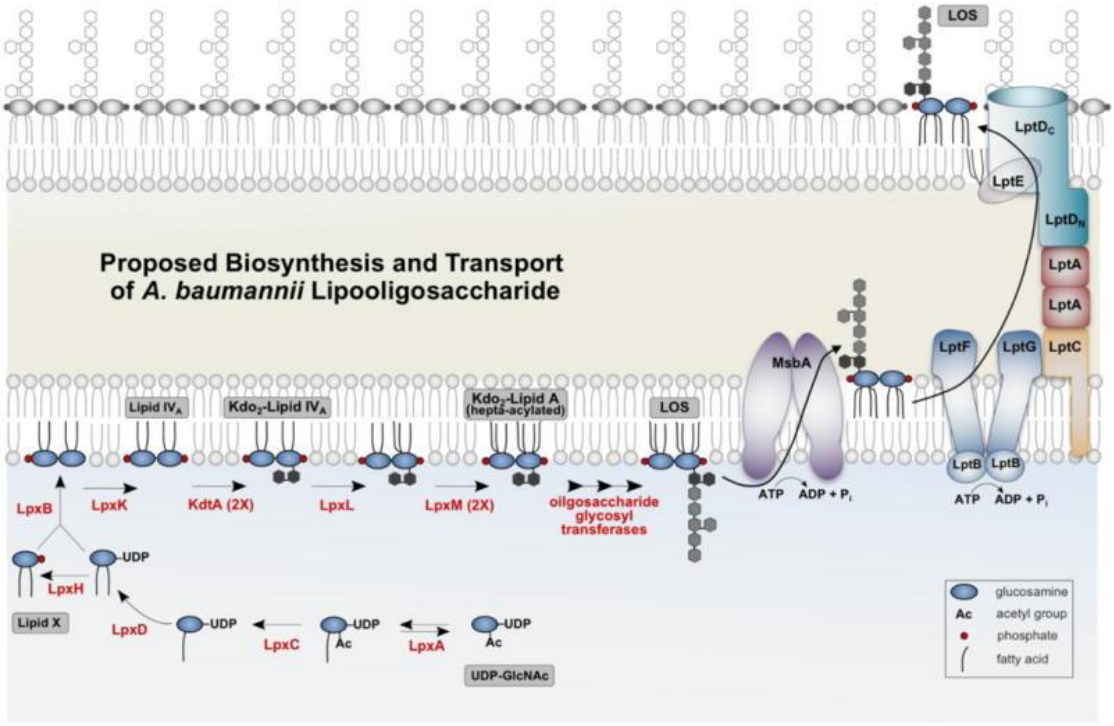


Figure 10: *Biosynthèse et transport du LOS chez A. baumannii (96)*

5.2. Mutation dans *pmrA/pmrB*

Le système de signalisation à deux composants PmrAB incluant une histidine kinase et son régulateur est impliqué dans la détection des niveaux environnementaux de pH, de Fe^{3+} et de Mg^{2+}. Chez *A. baumannii,* les mutations dans ce système induisent l'activation constitutive de *pmrAB* et conduisent à la surexpression de *pmrC* (homologue de *eptA* : éthanolamine phosphotransférase A) impliqué dans le transfert la phosphoéthanolamine (PEtN) aux phosphates du disaccharide glucosamine du lipide A. Cette surexpression induit une diminution de la charge négative du lipide A, et une réduction de l'interaction électrostatique avec les polymyxines, ce qui engendre la résistance (Figure 11) (97, 98).

La fréquence de mutations dans l'opéron *pmrABC* est supérieure à la fréquence des mutations dans *lpxACD,* en particulier dans les isolats cliniques de *A. baumannii* du fait de l'importante baisse de virulence apportée par la perte des LOS (95, 99). Par ailleurs, les mutants *lpx* sont plus facilement éliminés par les neutrophiles car ils présentent une sensibilité accrue à leurs lysozymes (100).

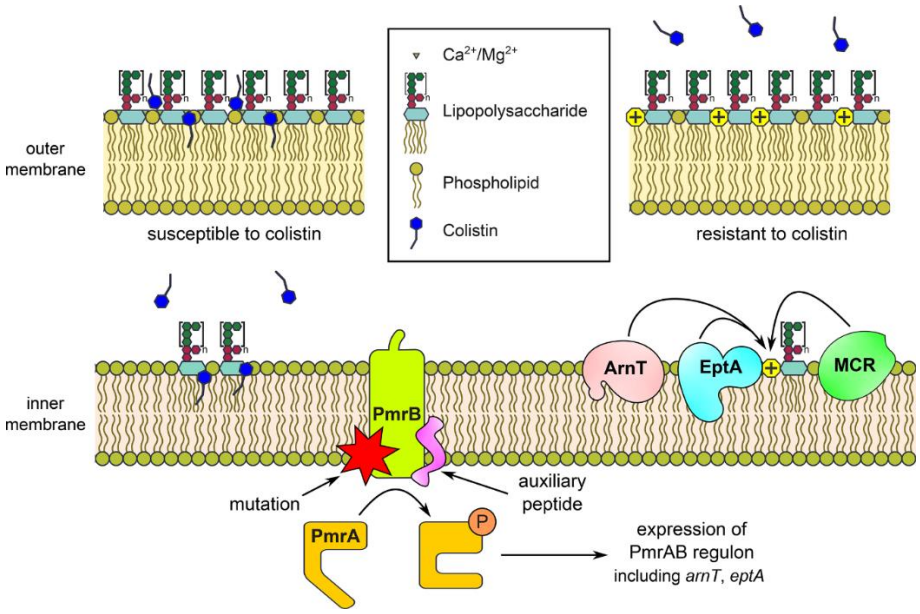


Figure 11: *Sensibilité et résistance à la colistine chez E. coli (101)*

5.3. Plasmide mcr-1

Un gène de résistance à la polymyxine porté par un plasmide, nommé *mcr-1*, a été signalé pour la première fois en Chine en 2015 (102). Le gène *mcr-1* code pour la PEtN transférase (MCR-1) qui catalyse l'ajout de phosphoéthanolamines aux groupes phosphates du lipide A (103). Ce mécanisme précédemment identifié via des mutations chromosomales dans *pmrA* ou *pmrB* est davantage préoccupant du fait de sa facilité de dispersion via des transferts horizontaux.

À ce jour, plusieurs autres variants MCR ont été identifiés chez différentes espèces, notamment les MCR-2, 3, 4, 5, 6 et 7, qui partagent respectivement 81%, 32,5%, 34%, 36,1%, 83% et 35% d'homologie de séquence d'acides aminés, avec MCR-1 (104). Chez *A. baumannii*, les variants *mcr-1* et *mcr-4.3* sont les plus fréquemment détectés (105).

Chapitre 4

Evaluation PK/PD *in vitro* des antibiotiques

Pour pallier le développement de résistance, de nouvelles molécules et spécifiquement de nouvelles classes d'antibiotiques ont besoin d'être développées et commercialisées. Toutefois, cela doit également être accompagné d'une meilleure utilisation de ces dernières, ainsi que celles déjà mises sur le marché. Pour cela, une optimisation des schémas posologiques pour une amélioration du ratio efficacité/toxicité et une réduction du développement de résistance doit être recherchée.

Les principaux éléments qui définissent l'activité d'un antibiotique sont la pharmacocinétique (PK) et la pharmacodynamie (PD) qui évaluent respectivement l'effet de l'organisme sur la molécule et l'effet du composé sur la bactérie (Figure 12). La PK d'une molécule se caractérise par différentes phases qui sont : son absorption, sa distribution et son élimination, incluant le métabolisme et l'excrétion. Présentant un réel intérêt pharmacologique, les agences de régulation comme la EMA (*European Medicines Agency*) ou la FDA (*Food and Drug Adinistration*) demandent l'inclusion d'études PK/PD pour les demandes de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques (106, 107).

Différentes approches peuvent être utilisées pour évaluer la relation PK/PD des antibiotiques, celles-ci sont basées la plupart du temps sur des expériences *in vitro* et/ou dans des modèles d'infection murins.

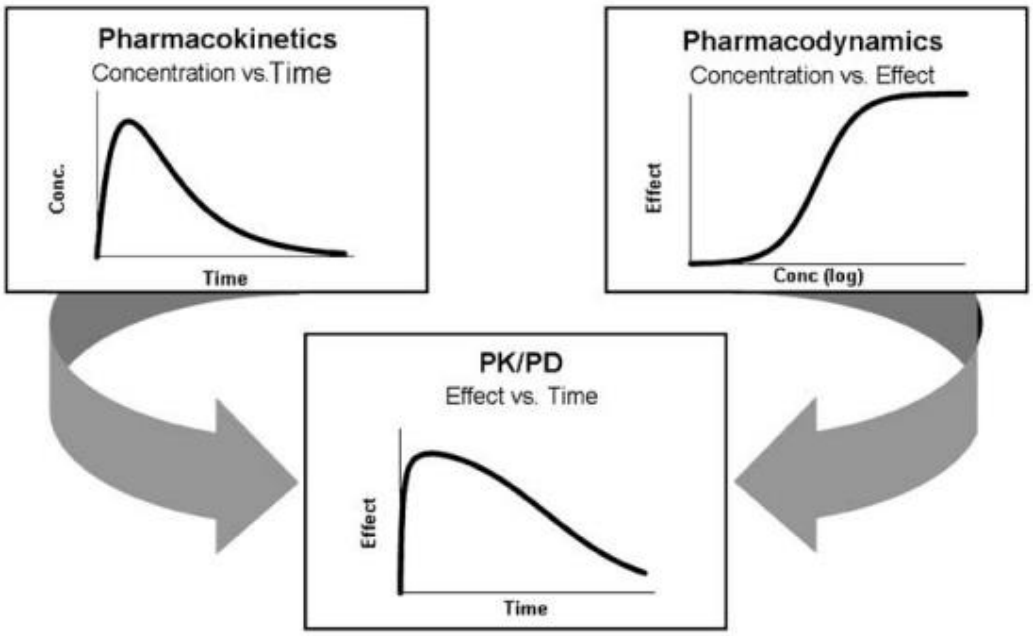


Figure 12: *Concept de l'approche PK/PD (108)*

1. DÉTERMINATION DE LA CMI

La concentration minimale inhibitrice ou CMI, est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique permettant d'inhiber la croissance bactérienne. C'est l'un des paramètres PD les plus couramment utilisés en recherche et en clinique pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique. Elle est reconnue comme test de référence par les organisations comme l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) ou le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) qui définissent des recommandations expérimentales pour la déterminer, principalement via deux méthodes.

1.1. Méthodes avec gradients

Les méthodes avec gradient comme les E-test® (bioMérieux) ou MICE® (Oxoid) sont des bandes commerciales contenant un gradient de concentration d'antibiotique. En les plaçant sur une gélose inoculée avec une suspension bactérienne à 0.5 MacFarland (~10^8 UFC/mL), un halo d'inhibition de croissance des bactéries se forme suite à la diffusion de l'antibiotique dans

la gélose. La mesure du halo se fait après 16h à 24h d'incubation et permet de définir la CMI (Figure 13) (109).



Figure 13: *Photo d'une détermination de la CMI par la méthode de gradient (110)*

1.2. La CMI en milieu liquide ou solide (micro-dilution)

L'évaluation de la CMI peut également se faire via micro-dilution, soit en milieu solide ou liquide. Pour la CMI en milieu solide, 10^4 UFC sont déposées par spot sur des géloses de milieu riche contenant différentes concentrations d'antibiotique (dilutions sérielles au demi). La CMI correspond à la plus petite concentration prévenant la pousse bactérienne après 16 à 24h d'incubation à 37°C. Pour la CMI en milieu liquide, un inoculum de 5.10^5 UFC/mL est ajouté dans des solutions contenant du milieu de culture et de l'antibiotique à différentes concentrations obtenues également par dilutions sérielles au demi (111). La CMI est déterminée visuellement après 16 à 24h d'incubation à 37°C et correspond à la plus petite concentration pour laquelle le milieu de culture est resté clair (*i.e.* sans trouble, caractéristique de la croissance bactérienne) (Figure 14). Pour les deux méthodes, l'inoculum de départ est préparé à partir d'une culture pure de bactéries dans du milieu riche généralement du Mueller-Hinton ajusté en cations (CAMHB).

La concentration minimale bactéricide d'un antibiotique (CMB) peut également être déterminé après la CMI, avec l'étalement des bactéries sur des géloses sans antibiotique (Figure 14). Elle est complémentaire à la CMI qui montre l'inhibition de croissance mais pas spécifiquement la mort des bactéries. Un antibiotique est considéré comme bactéricide si le ratio CMB/CMI ≤4, si le ratio est supérieur la molécule est considérée comme bactériostatique (112).

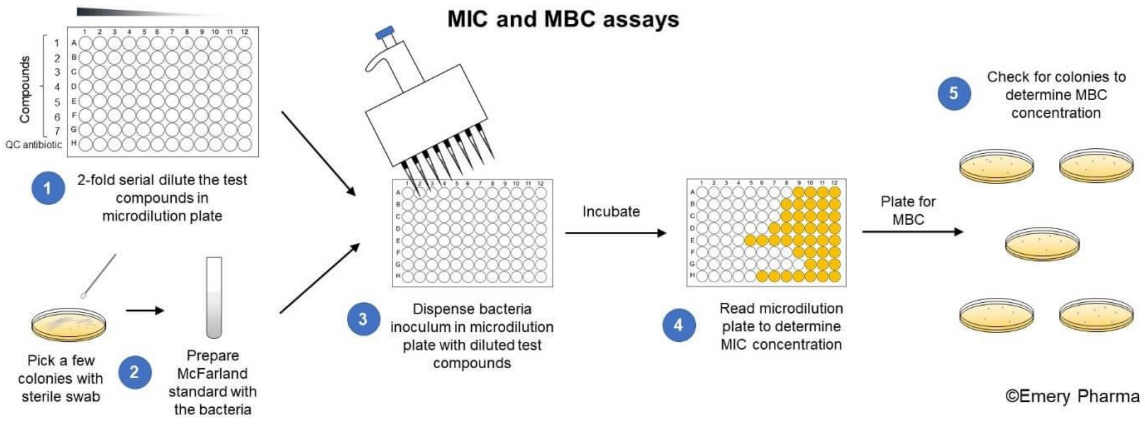


Figure 14: *Protocole de préparation pour l'évaluation de la CMI et CMB (113)*

2. LES INDICES PK/PD

Les travaux menés par Eagle *et al.* dans les années 1940-1950 ont démontré que la détermination de la CMI ne permettait pas à elle seule de décrire correctement l'activité des antibiotiques *in vivo* et que la PK de ces molécules devait être prise en compte (114–116). Ainsi, la relation PK/PD des antibiotiques a ensuite été majoritairement définie à l'aide d'indices, reliant la PK d'une molécule mesurée chez l'animal à la CMI (Figure 15). Cette approche a été appliquée à différentes molécules, infections, ou espèces bactériennes. Ces indices sont utilisés pour la détermination de schémas posologiques à tester en étude clinique (117), pour la détermination de breakpoints (118) et pour la détermination de cibles PD (*i.e.* valeur minimale de l'indice PK/PD) à atteindre afin d'être efficace en clinique (119). Si aucune réglementation n'indique le temps sur lequel doivent être déterminés ces indices, les études se font généralement sur une période de 24h chez les rongeurs. Les trois principaux indices sont les suivants : (le préfixe *f* indique que ce sont les concentrations libres des molécules qui sont prises en compte). Le fC_{max}/CMI, qui correspond au ratio de la concentration maximale libre plasmatique d'un antibiotique sur la CMI. Le *f*AUC/CMI qui représente le ratio entre l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques libres de l'antibiotique sur la CMI. Et $\%fT_{>CMI}$ qui traduit le pourcentage de temps entre deux prises consécutives pendant lequel les concentrations plasmatiques libres de l'antibiotique se situent au-dessus de la valeur de CMI.

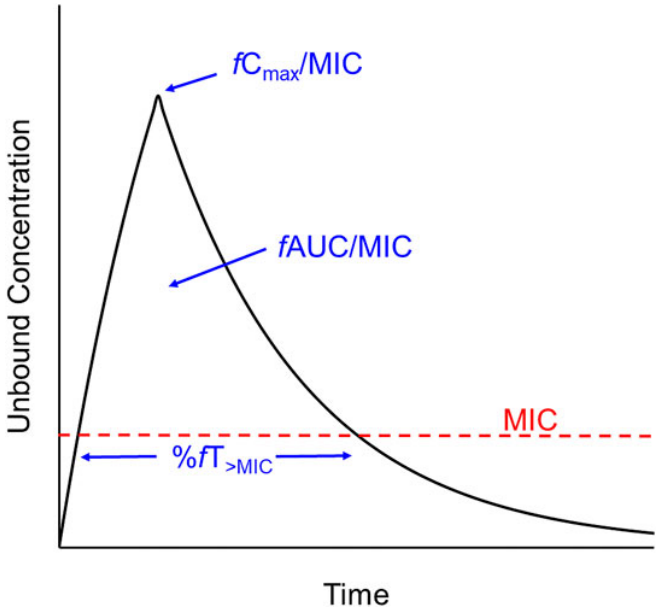


Figure 15: *Définition des indices PK/PD (120)*

Bien que largement utilisés dans l'évaluation de la relation concentration-effet pour différents antibiotiques, ces indices souffrent de nombreuses limites. Tout d'abord ils se basent la plupart du temps sur des mesures de concentration réalisées dans le plasma, or en antibiothérapie c'est la concentration libre au site d'action qui est efficace. S'il est juste d'évaluer la concentration plasmatique pour les bactériémies, pour les autres types d'infections telles que les infections pulmonaires ou neuro-méningées, la concentration d'antibiotiques au site d'action dépend du passage de barrière(s) biologique(s) et/ou de la liaison à des protéines extracellulaires. Deuxièmement, ces indices reposent sur un seul paramètre pharmacodynamique : la CMI. Ce paramètre est relativement simple à déterminer et est donc adapté à une utilisation en routine. Cependant, c'est un paramètre qui permet d'évaluer uniquement un effet moyen des antibiotiques sur la croissance bactérienne à un temps donné (après ~20h d'incubation), de plus, l'approche par dilution sérielle au demi et sa lecture visuelle rajoutent un manque de précision dans sa détermination. Il s'agit donc d'un paramètre statique relativement imprécis, évalué seulement à un instant donné et qui ne permet donc pas de caractériser l'évolution de l'effet d'un antibiotique au cours du temps (121). De plus, ce paramètre est largement dépendant des conditions d'expérimentation telles que le milieu de culture ou la taille de l'inoculum de départ. De ce fait, la CMI reste un paramètre *in vitro* dont l'interprétation et l'extrapolation doit rester prudente, en particulier

lorsque celui-ci est associé à des concentrations plasmatiques pour évaluer et prédire une efficacité antimicrobienne.

3. COURBE DE BACTÉRICIDIE (TIME-KILL)

Afin de mieux appréhender la complexité des relations antibiotiques-bactéries, la modélisation semi-mécanistique s'est développée à partir de tests permettant l'évaluation dans le temps de l'activité antimicrobienne d'une molécule sur des bactéries. Ces tests sont réalisés en conditions dîtes statiques où la concentration d'antibiotique est fixe dans le temps, ou en conditions dynamiques où les concentrations d'une molécule varient de manière à mimer son élimination chez les patients.

3.1. Time-kill en condition statique

Les time-kills (TK) en condition statique permettent de suivre l'action antimicrobienne d'une molécule à différentes concentrations, sur une culture bactérienne via des prélèvements successifs au cours du temps. Le dénombrement bactérien au cours du temps permet d'établir des courbes de bactéricidie et d'obtenir le profil d'action de l'antibiotique au cours du temps (Figure 16). Contrairement à la CMI, il n'existe pas de recommandations expérimentales pour les TK. Toutefois, ils sont généralement réalisés dans un milieu riche non-sélectif comme le CAMHB, contenu dans des tubes ou des plaques et placés sous agitation. L'expérience se fait généralement sur 24h ou 30h (sans rajout de milieu) et avec un inoculum de départ à 10^6 ou 10^7 UFC/mL.

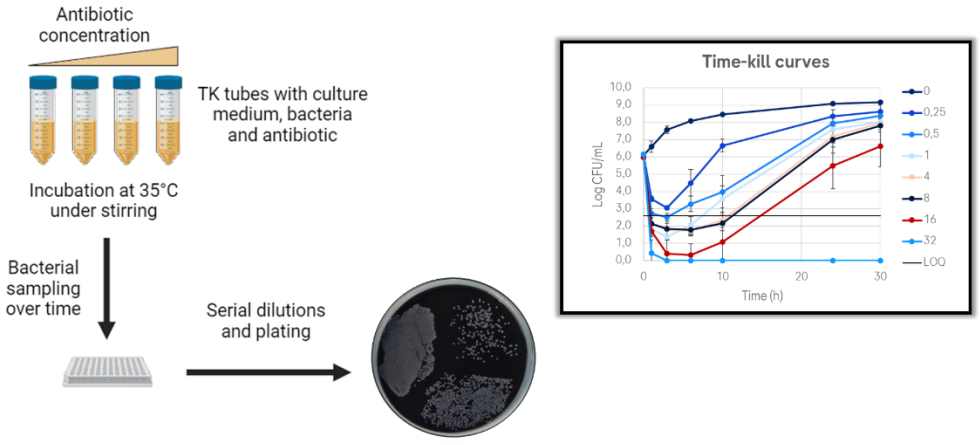


Figure 16: *Protocole de préparation d'expérience de TK, créé avec BioRender.com*

3.2. Time-kill en condition dynamique

3.2.1. Le système à un compartiment

Ce système permet de simuler les profils PK de molécules tels qu'observés *in vivo* (Figure 17). L'antibiotique est administré par bolus ou perfusion, au moyen d'une pompe à perfusion similaire à celles utilisées en pratique clinique, dans le réservoir central contenant un volume prédéfini de bouillon de culture bactérienne. Durant l'expérimentation, du milieu frais est ajouté en continu à l'aide d'une pompe péristaltique dans le réservoir central afin de faire varier les concentrations d'antibiotique dans le temps et simuler l'élimination observée dans l'organisme. Cette même pompe péristaltique est utilisée pour entraîner l'excédent de bouillon vers une bouteille de déchets afin de maintenir le volume du réservoir central constant. Ce système permet d'évaluer l'effet des antibiotiques sur des temps rallongés (entre 5 et 10 jours) par rapport aux TK statiques. Néanmoins, l'inconvénient principal de ce système est la perte dans le temps de bactéries du réservoir central du fait de leur élimination avec l'excédent de milieu.

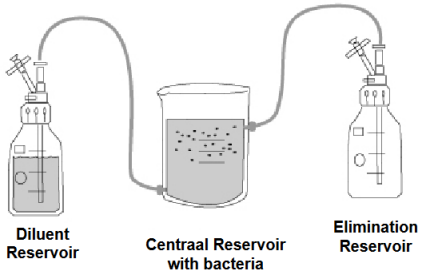


Figure 17: *Représentation du système à un compartiment (122)*

3.2.2. Système à deux compartiments

Autrement appelé Hollow-fiber Infection Model (HFIM), ce système pallie l'inconvénient principal du système à un compartiment en ayant un compartiment supplémentaire contenant les bactéries (Figure 18). La diffusion du milieu de culture et des molécules dans ce deuxième compartiment se fait à travers des fibres poreuses imperméables aux bactéries. De la même manière que le système à un compartiment, ce système permet d'échantillonner les bactéries au cours du temps et de simuler des profils PK d'antibiotique afin d'évaluer leur efficacité dans des conditions plus proches des systèmes *in vivo*.

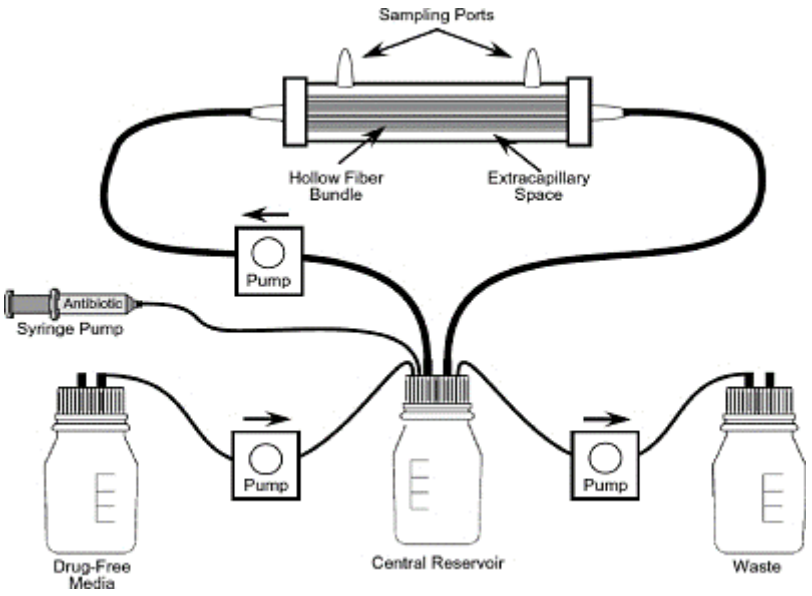


Figure 18: *Représentation du système à deux compartiments (123)*

4. LES MODÈLES SEMI-MÉCANISTIQUES

Les données de TK statique ou dynamique, traduisant l'action de l'antibiotique au cours du temps sur les bactéries peuvent être utilisées pour développer des modèles PK/PD qui permettent de différencier la croissance bactérienne, l'effet des antibiotiques et le développement de résistances.

4.1. Le modèle bactérien

Le modèle bactérien caractérise la croissance et la mort naturelle des bactéries en fonction du temps. Il est constitué d'un compartiment représentant une population homogène de bactéries et leur cycle de vie naturel. Ces bactéries se multiplient et meurent selon des constantes de vitesse de premier ordre : le K_{growth} et le K_{death} (Figure 19). Dans les expériences *in vitro*, les données sont insuffisantes pour distinguer les vitesses naturelles de croissance et de mort bactérienne, et c'est par conséquent la résultante, le K_{net} ($K_{net} = K_{growth} - K_{death}$), qui est estimée (124). La croissance des bactéries se caractérise par une phase exponentielle précédée parfois par une phase de latence, suivie d'une phase stationnaire où leur nombre atteint alors un plateau.

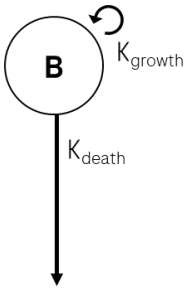


***Figure 19**: Représentation graphique d'un modèle PK/PD comprenant un compartiment bactérien B.*

4.2. Le modèle PK

Le modèle PK permet de caractériser les concentrations de l'antibiotique en fonction du temps. Dans le cas des TK statiques, la concentration est censée être constante mais parfois, une diminution des concentrations est observée, qui peut être due à une instabilité/dégradation de la molécule dans les conditions expérimentales. Cette diminution est caractérisée par une constante de vitesse d'ordre 1 ou 0 (K_{deg}) (Figure 20). Dans le cas des TK dynamiques, la diminution des concentrations d'antibiotique avec le temps est généralement caractérisée par une constante de vitesse d'élimination d'ordre 1 (k_e) même si des modèles PK plus complexes, incluant par exemple une constante de vitesse d'absorption, peuvent être utilisés selon le dispositif expérimental.

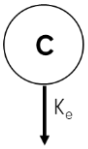


***Figure 20:** Représentation graphique d'un modèle PK comprenant un compartiment C représentant l'antibiotique*

4.3. Le modèle PK/PD

Le modèle PK/PD est formé par la combinaison du modèle bactérien et du modèle PK, il permet de caractériser l'effet de l'antibiotique sur les bactéries (Figure 21). L'effet antimicrobien peut être défini soit par une stimulation de la mort bactérienne, soit par une inhibition de la croissance bactérienne et peut être décrit par différentes fonctions dépendantes de la concentration en antibiotique.

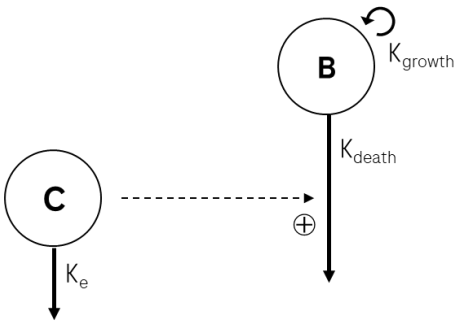


Figure 21: *Représentation graphique d'un modèle PK/PD*
Abréviations : B : compartiment bactérien, C : compartiment représentant l'antibiotique qui promeut la mort bactérienne

4.4. Les modèles PK/PD décrivant la résistance aux antibiotiques

Lors des expériences de TK *in vitro*, en particulier avec les bactéries à Gram négatif, les courbes de bactéricidie obtenues avec différentes concentrations d'antibiotique suivent souvent un profil incluant une décroissance initiale plus ou moins rapide suivie d'une repousse. Ces repousses, qui caractérisent une diminution de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique s'expliquent par différents mécanismes de résistance, qui sont modélisés traditionnellement à l'aide de deux types de modèle.

4.4.1. Le modèle à hétéro-résistance

Ce modèle comprend des compartiments représentant des populations homogènes de bactéries avec différentes sensibilités par rapport à un antibiotique (125, 126). Si la plupart du temps, deux compartiments représentant une population sensible (S) et une résistante (R) sont utilisés, un ou des compartiments représentant une ou des populations avec un ou des profils intermédiaires (I) peuvent être rajoutés (127, 128). Ces sous-populations sont présentes dès le début de l'expérience dans l'inoculum de départ, se développent et meurent normalement au cours de l'expérience. Dans ce modèle, les bactéries sensibles sont prioritairement éliminées par l'antibiotique, entrainant une diminution des UFC au début des expériences de TK. Les populations moins sensibles et/ou résistantes au contraire se développent, deviennent majoritaires et sont responsables de la recroissance observée (Figure 22).

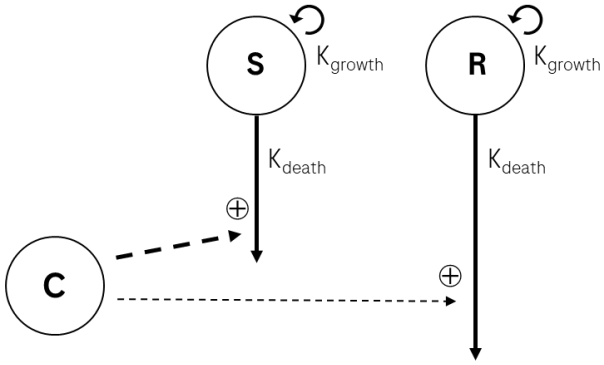


Figure 22: *Représentation graphique d'un modèle PK/PD avec hétéro-résistance*
Abréviations : C : compartiment représentant l'antibiotique à une concentration stable et qui promeut la mort bactérienne, S : compartiment bactérien représentant les bactéries sensibles, R : compartiment bactérien représentant les bactéries résistantes

Pour caractériser la présence de sous-populations de bactéries résistantes dans un inoculum, il existe principalement deux méthodes. Dans un premier temps, la présence de sous-populations peut être caractérisée phénotypiquement par un profil d'analyse de populations (PAP). Cette analyse consiste en l'étalement d'une suspension bactérienne sur des géloses contenant de l'antibiotique. Après 24h, le dénombrement des bactéries ayant poussées sur ces géloses permet la détermination de la fréquence de mutation. Cependant, cette méthode nécessite d'utiliser un fort inoculum et n'apporte pas d'information sur les mécanismes de résistance des bactéries, de plus la méthode dépend du choix la concentration d'antibiotique des géloses, qui diffère entres les études, bien qu'elle soit souvent fixée autour de 4 ou 8 fois la CMI (129, 130). La présence d'une sous-population résistante peut être dans un deuxième temps déterminée de manière génétique, grâce à la détection de mutant(s) via des tests de réaction de polymérase en chaîne (PCR) ou par du séquençage. En effet, différentes mutations ou la présence de gènes spécifiques ont été décrites comme inductrices de résistance telles que bla_{oxa48} ou bla_{KPC-2} pour les carbapénèmes (131), *mcr* et *pmrABCDE* pour les polymyxines (132) ou encore *gyrAB* et *parC* pour les fluoroquinolones (133).

4.4.2. Le modèle d'adaptation

Dans ce modèle, les bactéries sont initialement sensibles à l'antibiotique mais vont développer avec le temps des mécanismes d'adaptation réduisant l'action de celui-ci. Deux compartiments AR_{on} et AR_{off} représentant la fraction de bactéries adaptées et non adaptées respectivement, sont ajoutés dans le modèle avec K_{on}, la constante décrivant la vitesse de développement de la résistance adaptative. Cette résistance adaptative est réversible, et est caractérisée par une constante de vitesse K_{off}, qui ne peut cependant pas être estimée dans nos conditions expérimentales du fait du maintien de la pression de l'antibiotique. Au début de l'expérience, toutes les bactéries sont supposées ne pas être adaptées (AR_{on} = 0 et AR_{off} = 1) mais, en présence d'antibiotique, l'adaptation se développe au cours du temps réduisant son activité et expliquant la repousse observée en TK (134, 135) (Figure 23).

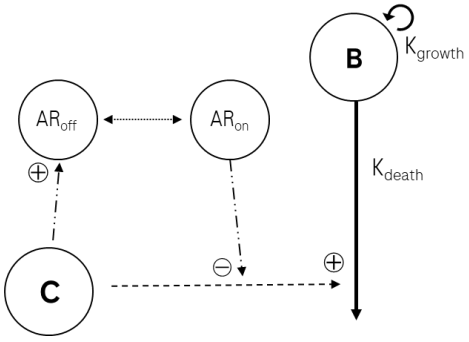


Figure 23: *Représentation graphique d'un modèle PK/PD d'adaptation*
Abréviations : B : compartiment bactérien, C : compartiment représentant l'antibiotique à une concentration stable et qui promeut la mort bactérienne, AR_{off} et AR_{on} : deux compartiments représentant l'adaptation.

Les mécanismes d'adaptation peuvent être étudiés par l'analyse de la variation d'expression de l'ARN messager (ARNm) bactérien après rétro-transcription en ADN, par PCR quantitative (*Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-qPCR) ou digitale (*Reverse transcription-polymerase chain reaction digital*, RT-dPCR) pour des gènes d'intérêt préalablement identifiés, ou par analyse transcriptomique (*i.e.* le séquençage de tous les ARNm de la bactérie) pour une approche plus globale. Ces mécanismes de résistance peuvent correspondre par exemple à une modification de la cible d'un médicament, à l'inactivation de celui-ci (136) ou à une expression accrue des pompes d'efflux (137–140). Des mécanismes

d'adaptation ont également été décrits dans diverses publications pour *A. baumannii* traité avec de la polymyxine B, en particulier pour les souches déficientes en LOS, où une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les systèmes d'efflux, l'enveloppe cellulaire et le remodelage de la membrane a été observée (141–143).

5. SIMULATION PK/PD

Les modèles PD développés à partir de données *in vitro* (TK statique ou dynamique) peuvent enfin être combinés à des modèles PK basés sur des données obtenues *in vivo* chez l'animal ou chez l'Homme, afin de prédire via des simulations l'effet de différents schémas posologiques sur les comptages bactériens au cours du temps (144–147). Ces simulations peuvent ainsi contribuer à la détermination de la posologie optimale d'un antibiotique ou la conception de futures études *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 5

Impact des conditions expérimentales *in vitro* sur la relation PK/PD des antibiotiques

L'évaluation de la relation PK/PD des antibiotiques est en partie basée sur des tests microbiologiques *in vitro* comme la détermination de la CMI ou les TK, tels que présenté dans le chapitre précédent. L'uniformisation des pratiques via la définition de conditions expérimentales standards par les organisations telles que l'EUCAST ou le CLSI, trouve son intérêt en clinique et dans la recherche, pour une meilleure compréhension et mise en parallèle des résultats entre les différents laboratoires. Ces pratiques consensus comme la taille de l'inoculum de départ (par exemple : 5.10^5 UFC/mL pour la CMI), le milieu de culture, le type de dilution de l'antibiotique, le temps d'incubation *etc.*, facilite le travail de laboratoire mais pose aujourd'hui la question de leurs pertinences. En effet, ces conditions expérimentales « artificielles » sont si différentes des conditions rencontrées *in vivo* que cela pose notamment un problème lorsque que les résultats ont besoin d'être transposés à l'*in vivo*. En effet, différentes études ont pu observer un manque de corrélation entre les prédictions basées sur les modèles *in vitro* et les données réelles *in vivo*. Ces différences ont nécessité la plupart du temps, un ajustement des paramètres en lien avec la croissance des bactéries et/ou l'activité des antibiotiques, ou même une restructuration des modèles PD *in vitro* afin d'améliorer les prédictions (148–155).

1. EFFET DU MILIEU DE CULTURE

L'une des principales spécificités des tests *in vitro* est le milieu utilisé pour cultiver les bactéries. Le bouillon ou la gélose riche en nutriments sont utilisés depuis des décennies pour la culture des bactéries. Les milieux tels que le sang, le milieu « Chocolat » contenant des globules rouges lysés, ou le Mueller-Hinton (bouillon ou agar) ont été sélectionnés afin de favoriser la croissance bactérienne de la plupart des micro-organismes non-exigeants rencontrés dans le domaine alimentaire ou médical, mais également pour leur bonne reproductibilité entre les lots. John Howard Mueller et Jane Hinton ont développé pour la première fois le milieu Mueller-Hinton en 1941, comme milieu non-sélectif adapté à la croissance de *Neisseria* (156). Composé d'extrait de bœuf et d'hydrolysat acide de caséine, ce milieu apporte de l'azote, des vitamines, du carbone, des acides aminés et d'autres nutriments essentiels à la croissance des micro-organismes. Ce milieu est également composé d'amidon, permettant l'absorption de métabolites toxiques produits par des bactéries qui peuvent interférer avec les antibiotiques, et qui une fois autoclavé, peut produire du dextrose et être utilisé par les micro-organismes comme source d'énergie (157). Utilisé préférentiellement depuis des années et reconnu aujourd'hui par plusieurs organisations internationales (ex : FDA, CLSI, EUCAST) (158–160), le Mueller-Hinton est aujourd'hui le milieu de culture bactérien standard utilisé *in vitro* pour la croissance bactérienne, mais également pour l'évaluation de l'efficacité des antibiotiques dans les tests précliniques. Cependant, les milieux de culture comme le Mueller-Hinton, utilisés lors des expériences *in vitro,* présentent peu de similitude avec les milieux biologiques, ce qui contribue aux divergences entre les résultats des expériences *in vitro* et *in vivo*.

1.1. Effet de la concentration en nutriments des milieux sur la croissance bactérienne

Les milieux de culture traditionnellement utilisés pour les études *in vitro* (CMI, TK), comme le Mueller-Hinton, fournissent un environnement riche pour la croissance bactérienne, et conduisent à une vitesse de croissance *in vitro* généralement supérieure à celle observée *in vivo* (149, 117). Les expériences de TK menées dans divers milieux biologiques, comme du liquide céphalo-rachidien (LCR) (161) ou du liquide péritonéal (162, 163), ont également

montré que la croissance des bactéries était plus lente que dans du bouillon Mueller-Hinton. Ces effets de réduction de la vitesse de croissance bactérienne avec la concentration en nutriments des milieux, ont été corroborés par les études *in vitro* où les concentrations de différents composant étaient diminuées, en particulier les sources de carbones (164, 165) ou le fer (166–168).

1.2. Effet de la concentration en nutriments des milieux sur le métabolisme bactérien

La concentration en nutriments dans les milieux de culture peut influencer la forme des bactéries (169–173), leurs configurations (174) et le métabolisme bactérien (175–182, 164, 183–185). En effet, des études ont montré qu'un appauvrissement des sources de carbones dans le milieu pouvait modifier les constituants des membranes bactériennes (186, 177). Par exemple, Gilbert e*t al.* (177) ont montré dans des expériences de TK dynamique avec du milieu minimum, que la réduction de la concentration en glucose induisait une augmentation chez *P. aeruginosa* de la proportion des phospholipides totaux et des LPS, ainsi qu'une diminution de la teneur en acide gras.

Outre l'influence de la source de carbone dans les milieux de culture, la présence d'ions impacte également le métabolisme des bactéries, comme cela a été démontré pour l'ammonium (187, 182, 184, 188, 189, 185), le calcium (190–193), le fer (194–197, 184), le magnésium (198–200, 175, 191, 201, 202, 189), ou le phosphate (200, 203, 178, 204–207). La présence d'ions dans le milieu, peut comme pour les sources de carbone, influencer la composition des membranes bactériennes (199, 194). En effet, Günther *et al.* (199) ont montré une augmentation des phospholipides totaux pour *E. coli* dans des milieux appauvris en magnésium, mais également un changement dans le motif membranaire avec plus de cardiolipines et moins de phosphatidylglycérols et de phosphatidyléthanolamines. De plus, l'activation des cascades métaboliques des bactéries est directement liée à la composition du milieu de culture. Par exemple, chez *A. baumannii,* un milieu déplété en fer induit l'activation de différentes voies de signalisation notamment la synthèse de sidérophores (molécules chélatrices de fer, sécrétées par les bactéries pour leur permettre d'acquérir le fer de l'environnement après la réabsorption du complexe sidérophore-Fe^{3+}), mais il induit

également l'expression de gènes impliqués dans la virulence bactérienne comme montré sur la figure ci-après (196).

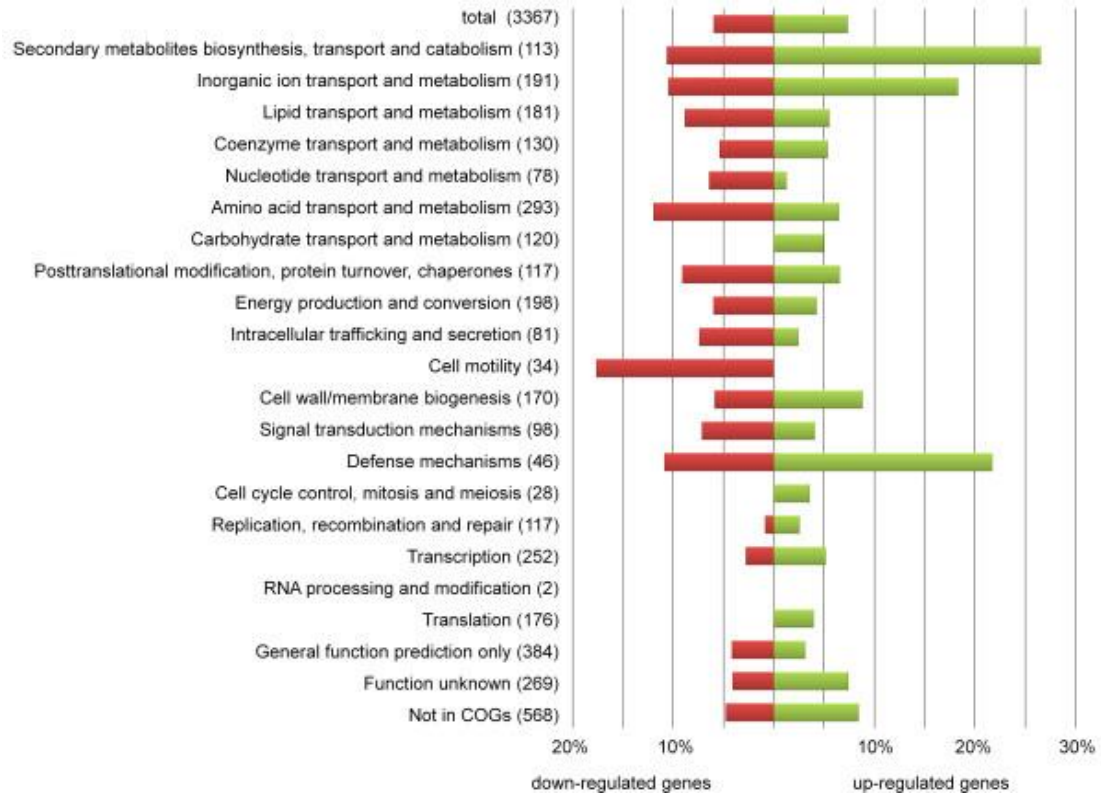


Figure 24: *Résultat de puce à ADN décrivant les pourcentages de sur (vert) et sous-expression des clusters orthologues (COG) d'A. baumannii en condition limitée en fer (196)*

Chen et al. (167) ont observé des résultats similaires avec *K. pneumoniae,* ils ont par ailleurs montré que les souches cultivées dans des milieux LB (bouillon Luria-Bertani) enrichis en fer, présentaient une augmentation significative de leurs virulences dans un modèle d'infection de *Galleria mellonella*.

De plus, des études ont montré que des conditions limitantes en phosphate pouvaient induire des mutations (205) ou modifier le nombre, ou le type de porines à la surface des membranes (203, 187, 181, 184, 188), ce qui peut être une cause directe de résistance aux antimicrobiens puisque les porines sont utilisées pour la pénétration des antibiotiques dans les cellules ou leurs excrétions. Par exemple, Overbeeke *et al.* (203) ont montré une augmentation de *ompF* dans les milieux limités en glucose, gène directement impliqué dans la résistance aux β-lactamines (208–210).

1.3. Effet du milieu de culture sur l'effet des antibiotiques

L'activité des composés est directement liée au milieu *in vitro* dans lesquels ils sont évalués, et c'est pourquoi des recommandations de milieu ont été établies pour certains antibiotiques. Pour le céfidérocol, pour les tests de CMI ou de disques, un milieu appauvri en fer est recommandé (211). En effet, dans les milieux déplétés en fer, une augmentation de la concentration intracellulaire du céfidérocol et donc un effet accru de celui-ci ont été démontrés (212). C'est également le cas de la tigécycline pour laquelle, il a été révélé que son activité était affectée par la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu. De ce fait, l'utilisation de bouillon Mueller-Hinton frais ou une supplémentation en oxyrase a permis d'obtenir une méthode d'essai plus standardisée pour la détermination des CMI (213, 214). Cependant, ces conditions s'éloignent encore une fois des conditions rencontrées *in vivo* et l'évaluation de l'efficacité des antibiotiques dans les milieux de culture *in vitro* standard peut présenter des différences avec celle réalisée dans des milieux plus physiologiques.

1.3.1. Milieux appauvris

La diminution de la vitesse de croissance de bactéries observée dans les milieux appauvris, influence l'activité de différentes classes d'antibiotiques (215). En effet, il est reconnu que les antibiotiques sont plus efficaces sur les bactéries à croissance rapide (165). Cette notion sert de fondement au concept de persistance bactérienne : les cellules bactériennes dormantes qui ne se développent pas, sont phénotypiquement tolérantes au traitement antibiotique. Par exemple, des études de TK ont montré que *E. coli* était moins sensible aux β-lactamines lorsque les bactéries étaient cultivées avec des concentrations réduites en glucose, induisant une réduction de la vitesse de croissance (216, 217). Certaines études ont au contraire montré que l'effet antimicrobien était augmenté dans des milieux appauvris malgré une diminution de la vitesse de croissance des souches (165, 218).

1.3.2. Milieux supplémentés

Pour une meilleure corrélation avec l'*in vivo*, le milieu de culture *in vitro* peut être complété par des composants que l'on retrouve dans les organismes. Par exemple, l'ajout de sérum humain dans les milieux de culture, induit la plupart du temps une diminution de l'effet antimicrobien observé (219–221), du fait de l'activation de mécanismes de résistance par les

composants sériques (221) ou la plupart du temps, du fait de la liaison de l'antibiotique à ces composants (222). Cependant, une fois les concentrations totales corrigées par la fixation protéique ou pour les molécules peu fixées, certaines études ont montré que l'ajout de sérum dans le milieu induisait une potentialisation des effets antimicrobiens, grâce notamment à l'action du complément (223–225). Toutefois, cette potentialisation est dépendante des espèces bactériennes (225) et notamment de la capacité des bactéries à pousser dans le sérum (226, 227).

1.3.3. Milieux proche des milieux biologiques

Afin d'être le plus proche possible de l'environnement *in vivo*, des milieux dont la composition s'apparente aux milieux biologiques peuvent être utilisés. Par ailleurs, l'activité des antibiotiques dans ces milieux, est souvent différente de celle mesurée dans les milieux classiques de laboratoire. Par exemple, Hennessen *et al.* (228) ont décrit que les valeurs de CMI des dérivés de la tétracycline étaient diminuées dans l'urine artificielle par rapport au CAMHB. Il y a aussi des études de TK qui montrent que l'activité du linézolide vis-à-vis de *S. aureus* est augmentée dans le LCR comparé au CAMHB (161) alors que l'activité de la fosfomycine vis-à-vis de plusieurs souches (*E. coli, P. aeruginosa, S. epidermidis,* et *S. aureus*) est diminuée dans le liquide de dialyse péritonéale (229). Cette réduction d'effet a été également observée pour d'autres antibiotiques (*i.e.* céfépime, ciprofloxacine, ertapénème, méropénème et tobramycine) avec *E. coli* (230).

Il est également important d'utiliser ces milieux proches des milieux biologiques afin de pouvoir déterminer les concentrations libres des antibiotiques au niveau du site infectieux. Par exemple, la fraction libre et donc active de plusieurs antibiotiques a été déterminée *in vitro* dans un milieu simulant le fluide de revêtement épithélial (ELF) afin de corriger ensuite les concentrations totales mesurées dans l'ELF chez des souris (231). Les concentrations libres, ainsi déterminées en multipliant les concentrations totales par la fraction libre, permettaient alors de mieux prédire l'efficacité observée dans un modèle murin d'infection pulmonaire.

Enfin, la présence de cations dans les milieux de culture peut également interférer avec l'activité de certains composés comme les polymyxines en déplaçant l'antibiotique de son site de liaison et en réduisant son activité détergente sur les membranes bactériennes (232–234).

En revanche, les cations peuvent potentialiser l'activité d'autres antibiotiques tels que les aminoglycosides, la tigécycline ou la tétracycline (235, 236, 219, 237).

Les milieux utilisés pour la culture des bactéries *in vitro*, ne sont donc pas sans conséquences sur la croissance de celles-ci et sur l'effet des antibiotiques. Mais d'autres paramètres d'expériences *in vitro* peuvent également avoir un impact.

2. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE

2.1. La température

La température pourrait être le paramètre de culture *in vitro* le plus standardisé. Bien qu'elle puisse parfois être adaptée pour des besoins/expériences spécifiques, elle est généralement établie à 35 ± 2°C. Cette valeur convient à la fois pour la croissance de la plupart des micro-organismes, mais aussi parce qu'elle est proche de la valeur physiologique du corps humain. Cependant, il est intéressant de se demander si la valeur de ce paramètre est pertinente, d'autant plus que la température du corps humain peut varier et augmenter jusqu'à 41°C en cas de fièvre. La fièvre est une réponse physiologique à des pyrogènes tels que le LPS bactérien, les interleukines, le facteur de nécrose tumorale (TNF)-α, *etc.* (238) et a tendance à être bénéfique pour les patients infectés (239–241). Plusieurs raisons peuvent expliquer cet effet protecteur. Premièrement, il s'est avéré qu'une température élevée n'était pas optimale pour la réplication bactérienne des agents pathogènes infectieux humains (242–244). Deuxièmement, il semblerait que de nombreuses classes d'antibiotiques comme les aminoglycosides ou les céphalosporines auraient tendance à avoir une activité potentialisée *in vitro* avec l'augmentation de la température (245, 246). Et troisièmement, une température élevée est associée à une activité améliorée du système immunitaire contre les bactéries (247, 248). La modification de température peut influencer la composition des membranes bactériennes en entrainant une augmentation de la proportion d'acides gras saturés dans la membrane bactérienne externe avec l'augmentation de la température (249–255), ce qui peut affecter sa fluidité et sa perméabilité. De plus, l'augmentation de la température peut soit diminuer la virulence bactérienne par une diminution de pilin (protéine fibreuse des pili) (176) ou l'augmenter avec une stimulation de l'expression des porines comme OmpC, ce qui

peut donc moduler la virulence et résistance bactérienne (256). Alors qu'une diminution de la température à 30°C réprime l'expression des systèmes d'efflux RND (*Resistance-Nodulation-Division*) (257).

Par ailleurs, la température entraine souvent la dégradation des antibiotiques et doit être prise en compte en particulier *in vitro*, dans les expériences longues ou statiques telles que les TK où la concentration est considérée comme constante tout au long de l'expérience. C'est notamment le cas pour les carbapénèmes, avec l'exemple du méropénème pour lequel une perte de 62,9 % en 24h a été observée dans le CAMHB à 37°C (258). Si la perte peut être compensée par une supplémentation au cours de l'expérience (259), elle peut également être intégrée dans les modèles PK/PD. Par exemple, Mohamed *et al.* (146) ont pris en compte la dégradation de la colistine et du méropénème au fil du temps dans des expériences de TK avec *P. aeruginosa.*

2.2. Niveau d'oxygène

Le taux d'oxygène est un paramètre essentiel pour la culture des bactéries qui peuvent être classées selon leur besoin et leur tolérance à celui-ci (aérobie ou anaérobie, stricte ou facultative). Si la plupart des microorganismes pathogènes sont cultivés en condition aérobie, certains pathogènes humains sont des anaérobes facultatifs tels que *P. aeruginosa* ou *E. coli* (260). Ils sont en effet capables de se développer dans des environnements pauvres en oxygène en modifiant leur voie de synthèse d'ATP pour l'approvisionnement énergétique comme c'est le cas pour *P. aeruginosa* qui utilise l'arginine ou le nitrate comme accepteur d'électrons alternatif (261).

La faible disponibilité en oxygène est d'ailleurs l'une des caractéristiques des biofilms, mais elle n'empêche pas les pathogènes de se développer au sein de ces structures comme l'a montré Yoon *et al.* (262) avec *P. aeruginosa* qui forme de meilleurs biofilms en croissance anaérobie. Le niveau d'oxygène peut être également réduit dans différentes conditions cliniques telles que les brûlures, les abcès ou les poumons de patients atteints de mucoviscidose (263, 264). En effet, il a été démontré que chez ces patients, les bactéries développaient un biofilm enveloppé dans le mucus stagnant, reproduisant des conditions similaires à celles de l'anaérobie (262, 265).

La limitation en oxygène a diverses conséquences sur la physiologie et la membrane des bactéries entrainant une réduction de la vitesse de croissance (266), et a un impact sur l'activité antimicrobienne des composés. Plusieurs antibiotiques voient leur activité *in vitro* diminuée avec des concentrations d'oxygène réduites, notamment le triméthoprime et le sulfaméthoxazole (267, 268), mais la principale classe concernée est celle des aminoglycosides avec la tobramycine, la gentamicine ou l'amikacine (269–276). En effet, Gupta *et al.* (276) ont décrit en condition d'anoxie, une augmentation de la CMI de plus de 4 et 8 fois respectivement pour la gentamicine et la tobramycine, contre *K. pneumoniae.* Cette diminution d'efficacité des aminosides peut s'expliquer par le fait que l'entrée de ces antibiotiques dans la cellule dépend de mécanismes de transport spécifiques nécessitant une phosphorylation oxydative (318). En revanche, l'impact de l'oxygène semble plus modéré sur l'activité des β-lactamines telles que les carbapénèmes (270, 273, 274).

Les environnements hypoxiques ne constituent pas nécessairement un inconvénient pour les antibiotiques. Par exemple, la fosfomycine est transportée dans la cellule par deux systèmes de transport de nutriments, le transporteur de glycérol-3-phosphate (glycérol-3-P) (GlpT) et le transporteur de glucose-6-phosphate (glucose-6-P) (UhpT) (277, 278). Cependant, en cas de limitation en oxygène, une expression élevée de glpT a été observée (279, 280), augmentant la pénétration de la fosfomycine et par conséquent, son activité par rapport aux conditions aérobies (273, 281, 280, 279).

Bien que plusieurs pathogènes soient responsables d'infections à anaérobies, il existe peu d'études PK/PD réalisées dans ces conditions. L'efficacité du levornidazole, antibiotique recommandé pour le traitement des infections anaérobiques telles que les infections intra-abdominales, a par exemple été étudié dans un système *in vitro* dynamique reproduisant les conditions d'anaérobie nécessaires pour la culture de *Bacteroides fragilis* (282).

Le taux d'oxygène dans les cultures bactériennes est un élément important à prendre en compte lors des expériences *in vitro* en accordant une attention particulière à la force d'agitation et au rapport air/liquide. En effet, les tests de CMI sont la plupart du temps réalisés en plaque de 96 puits sans agitation, alors que les TK statiques sont réalisés sous agitation dans des tubes, des erlenmeyers ou en plaques de 6, 12 ou 24 puits. Cela permet une oxygénation plus importante du milieu que pour les tests de CMI, et cela pourrait être la

source des discordances entre les résultats de CMI et TK, où pour ces derniers, des repousses sont souvent observées à des concentrations bien supérieures à la valeur de CMI.

3. CULTURE EN BIOFILM VERSUS PLANCTONIQUE

La plupart des tests d'évaluation des antimicrobiens *in vitro* se font sur des cultures planctoniques, où les bactéries sont en suspension dans du milieu liquide et sous agitation. Cependant, dans l'environnent, les bactéries sont plus souvent retrouvées sous forme de biofilm. En effet, ils sont responsables de plus de 80 % des infections bactériennes et de 60 % des infections nosocomiales (283). En clinique, les biofilms peuvent se former sur du matériels ou dans les tissus (ex : peau, os, poumon, etc.) (284). Les biofilms sont souvent responsables d'infections récalcitrantes qui se maintiennent sous la pression des antibiotiques, et qui peuvent réapparaître après l'arrêt des traitements.

Le biofilm est une structure bactérienne connue qui maintient les bactéries dans une matrice extracellulaire composée de différents éléments tels que des polysaccharides, des protéines sécrétées, de l'ADN extracellulaire, *etc.* (285, 286) (Figure 25). La formation de biofilm s'effectue en plusieurs étapes : adhésion initiale, phase de développement précoce puis phase de maturation aboutissant à une phase dite de dispersion, avec détachement d'une partie des bactéries sous formes isolées (planctoniques) ou de micro-agrégats, qui seront susceptibles de coloniser d'autres surfaces. Les bactéries qui évoluent dans cette structure sont considérées comme quiescentes (287, 288), et ont des profils d'expression géniques modifiés par rapport aux planctoniques (289, 290). A la différence des cultures planctoniques, les cultures en biofilm sont réalisées à la surface de matériaux où les bactéries peuvent adhérer, et où les bactéries sont laissées sans agitation généralement 24h-48h pour permettre la formation d'agrégats et la sécrétion de leur matrice extracellulaire caractéristique des biofilms.

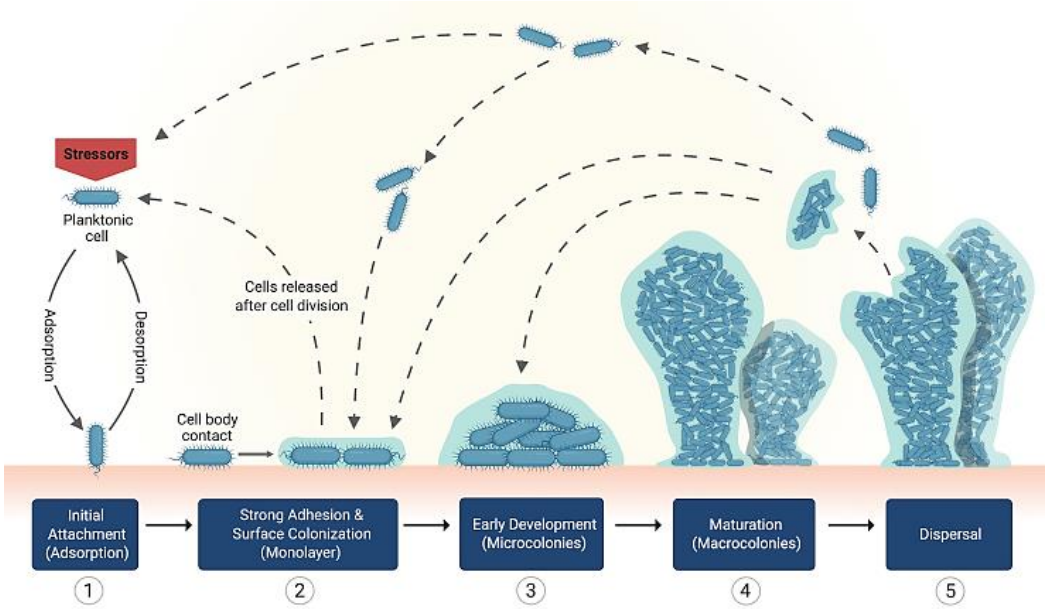


Figure 25: *Représentation des étapes de formation d'un biofilm (291)*

Pour étudier les biofilms et plus particulièrement l'action des antibiotiques sur ces structures, les tests usuels de microbiologie doivent être adaptés. Comme l'utilisation de matériels spécifiques (par exemple les *Calgary biofilm devices* (292)) pour les CMI, qui sont par ailleurs redéfinies en tant que Concentration Minimale d'Inhibition du Biofilm (CMIB). Les biofilms peuvent également être étudiés en TK statique et dynamique. Dans le cas des TK statiques, des billes présentant des biofilms bactériens à leurs surfaces sont inoculées dans du bouillon avant l'ajout d'antibiotique. Les billes sont alors échantillonnées à différents temps, placées dans un sonicateur afin de décrocher les bactéries pour leurs étalements sur géloses (293, 294). De plus, les biofilms peuvent être étudiés en HFIM, où les bactéries sont inoculées 3 jours avant l'ajout des antibiotiques, de façon à induire la formation du biofilm (295).

Cette structure bactérienne a une conséquence directe sur l'action des antibiotiques, qui est diminuée soit à cause de la barrière physique que les biofilms constituent, ou du fait de l'état métabolique quiescent des bactéries (Figure 26). Par rapport aux bactéries planctoniques, des concentrations plus élevées et une période de traitement plus longue sont nécessaires pour éliminer les biofilms, comme observé dans un modèle *in vitro* dynamique de biofilm à *P. aeruginosa* où l'efficacité de plusieurs doses de ceftazidime administrées en perfusion continue afin de maintenir des concentrations supérieures à la CMI pendant la durée totale du traitement a été évaluée (296). Il a alors été démontré que la ceftazidime avait une activité

anti-biofilm concentration dépendante et que son efficacité était augmentée en cas d'administration de doses élevées, particulièrement en association avec la colistine. De nouveaux indices PK/PD ont été définis pour tenir compte des paramètres de sensibilité liés au biofilm, afin de mieux prédire l'efficacité de composés sur ceux-ci. Ces indices sont l'aire sous la courbe AUC/MBIC ou AUC/MBEC, et le temps au-dessus de la MBIC ou MBEC (T>MBIC et T>MBEC) ; où la MBIC correspond à la concentration minimale d'inhibition du biofilm et la MBEC à la concentration minimale d'éradication du biofilm (297).

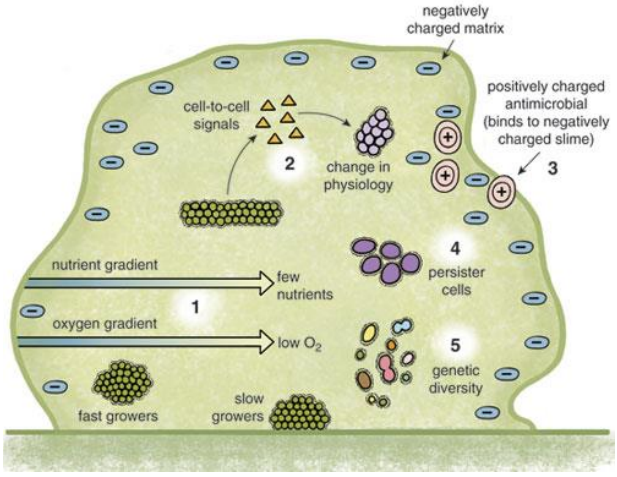


Figure 26: *Représentation d'un biofilm avec les différents facteurs influençant l'activité des antibiotiques (298)*

Il existe des modèles PK/PD semi-mécanistiques prenant en compte les bactéries persistantes ou en quiescence (299–301, 135, 302–307) mais peu considèrent le biofilm bactérien. Sou *et al.* (308) ont construit un modèle décrivant l'action antimicrobienne de la tobramycine sur différents états physiologiques de *P. aeruginosa* avec un compartiment pour les bactéries planctoniques avec une croissance rapide ; un compartiment pour l'état biofilm avec une croissance plus lente et un pour l'état quiescent. Les états planctoniques et en biofilms sont sensibles aux antibiotiques et les bactéries peuvent évoluer vers l'état quiescent, insensible à ceux-ci (Figure 27).

Les biofilms sont très hétérogènes, leurs propriétés dépendent en particulier de l'espèce bactérienne, de la localisation anatomique et des nutriments.

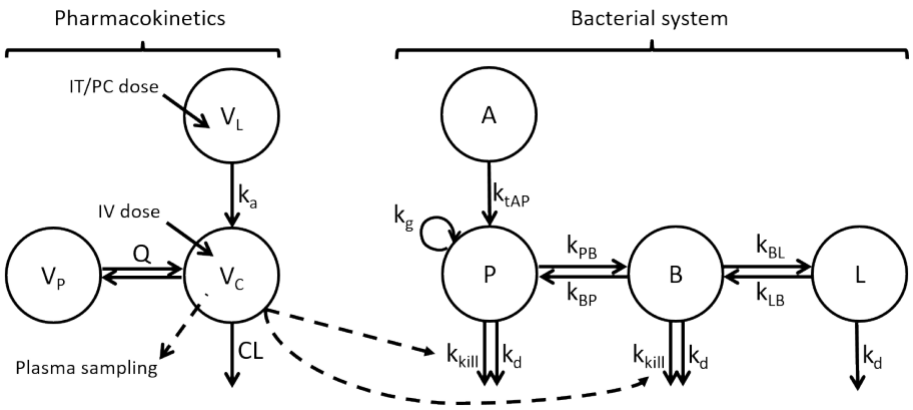


Figure 27: *Représentation schématique du modèle PK/PD de Sou et al*
Comprenant le modèle PK de la tobramycine, le modèle PD d'infection chronique avec les sous-populations de P. aeruginosa et l'effet de la tobramycine sur la potentialisation de la destruction des bactéries (308)*. Abréviations : CL = Clairance ; k_a = constante d'absorption ; Q = clairance inter-compartimentale ; V = volume du compartiment central (V_C), du compartiment tissulaire périphérique (V_P) et du compartiment pulmonaire (V_L) ; A = état sur gélose, P = état planctonique, B = état de biofilm, L = état latent ; K_{tAP} = constante de vitesse de passage à l'état planctonique ; k_g = constante de vitesse de croissance des bactéries ; k_d = constante de mortalité ; k_{kill} = constante de mortalité de l'antibiotique ; SLP = paramètre de pente de l'effet du médicament ; C = concentration du médicament; k_{PB}, k_{BP}, k_{BL} et k_{LB} = constante de vitesse de transition des bactéries de P à B, B à P, B à L et L à B, respectivement.*

4. EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM

Les études évaluant l'efficacité des antibiotiques *in vitro* sont souvent réalisées avec un inoculum bactérien à 10^5, 10^6 voire 10^7 UFC/mL, ce qui n'est pas toujours représentatif des infections observées en clinique. Par ailleurs, la densité bactérienne (nombre de bactéries viables par gramme ou millilitre) au niveau des sites infectieux peut varier en fonction du type d'infection, de l'espèce bactérienne, mais aussi selon les individus (309). Par exemple, des densités bactériennes comprises entre 10^3 et 10^9 UFC/mL ont été observées pour les infections abdominales, pulmonaires, urinaires, des tissus mous ou les méningites (310–312, 309). 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 nommé l'effet inoculum est connu depuis les années 1980, et a été décrit pour plusieurs associations de bactéries et de composés, principalement *in vitro* dans des tests de CMI (313–323), mais également en TK statique (324–337, 127, 338–341) ou dynamiques (342–344).

Dans la plupart des cas, l'effet était caractérisé par une diminution de l'efficacité du composé avec une augmentation de l'inoculum. L'effet inoculum a également été décrit dans des modèles d'infection *in vivo* pour lesquels une mortalité accrue des animaux était associée à un inoculum élevé (345–352). Ainsi, les cibles PK/PD basées sur des valeurs de CMI déterminées avec un inoculum standard ne sont pas toujours prédictives de l'efficacité *in vivo* des antibiotiques quand l'inoculum est élevé. Par exemple, la céfépime a montré un effet antimicrobien modeste dans un modèle murin de septicémie à *K. pneumoniae* causée par l'injection d'un fort inoculum (10^7 CFU/g), malgré une bonne sensibilité de cette souche à l'antibiotique avec une CMI de 1 mg/L à 10^5 CFU/mL et l'administration de doses permettant de maintenir des concentrations 100% T>CMI (328). De plus, de par l'effet inoculum, le taux de mortalité dans le groupe de souris traitées par la céfépime était comparable à celui observé dans le groupe contrôle non traité. Cependant, ce phénomène dépend des antibiotiques puisqu'il a été observé pour les polymyxines (335, 342, 338, 340, 154), certaines céphalosporines (313, 324, 317, 316, 325, 319, 326, 320, 328, 321, 347, 330, 341, 332, 343, 322, 323), les aminoglycosides (127, 317, 318, 328), ou les associations d'antibiotiques (325, 330, 343, 351, 337, 323) mais dans une moindre mesure pour les fluoroquinolones (317, 348, 331), ou les carbapénèmes (324, 317, 319, 328, 330, 321, 332, 342, 342, 337).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène. Premièrement le fait que le nombre de cellules bactériennes soit plus élevé pour une même concentration de composé entraîne une diminution du nombre de molécules disponibles par bactérie et donc une moindre d'efficacité, car très probablement plus d'une molécule est souvent nécessaire pour l'action du composé (353). Un modèle mathématique empirique, décrivant la diminution de la concentration efficace en pipéracilline avec l'augmentation de la taille de l'inoculum initial, a ainsi été développé afin de caractériser la diminution de l'efficacité de l'antibiotique vis-à-vis d'*E. coli* avec un fort inoculum (10^8 UFC/mL) par rapport à un inoculum plus faible (10^5 UFC/mL) lors de TK statiques (333). Deuxièmement, la présence d'un inoculum bactérien élevé peut entraîner une production accrue d'enzymes et de métabolites agissant sur les antibiotiques tels que les β-lactamases et, par conséquent, une plus grande dégradation des composés (354). Troisièmement, un inoculum élevé peut être associé à une production accrue par les bactéries de molécules signal du quorum sensing qui peuvent modifier la virulence des bactéries et donc leurs réponses à l'antibiotique (341). L'implication du *quorum sensing* a

particulièrement été évoquée par Bulitta *et al.* lors de l'étude *in vitro* de l'impact de la taille de l'inoculum de *P. aeruginosa* sur l'activité de la ceftazidime (341), de la tobramycine (127) ou encore de la colistine (334) dans des expériences de TK. L'effet inoculum a alors été caractérisé à l'aide d'un modèle PK/PD semi-mécanistique par une augmentation, en présence d'une forte densité bactérienne, de la production et de la libération de molécules signales qui induisent des changements phénotypiques inhibant la croissance des bactéries et l'activité des antibiotiques.

Par ailleurs, un inoculum élevé induit une entrée plus rapide des bactéries en phase stationnaire, donc les bactéries sont moins actives métaboliquement, elles produisent moins de récepteurs et leur taux de réplication diminue, ce qui altère l'activité des composés bactéricides, comme illustré par le modèle PK/PD semi-mécanistique développé par Nielsen *et al.* (339) décrivant l'effet inoculum d' *E. coli* sur l'activité de la ciprofloxacine. Dans ce modèle, où les bactéries peuvent se présenter sous trois états physiologiques différents nommés S (bactéries en croissance sensible à l'antibiotique), R (bactéries résistantes et en quiescence) et Nc (bactéries sensibles, quiescentes et ne formant pas de colonies), le transfert de l'état S à R est proportionnel à la densité bactérienne (Figure 28). Ainsi, avec un inoculum élevé, le taux de transformation de S en R augmente, ce qui conduit à un nombre plus élevé de bactéries en quiescence sur lesquelles l'antibiotique n'est pas actif. De plus, un inoculum élevé augmente la possibilité d'avoir différentes sous-populations bactériennes et différents niveaux de résistance aux antibiotiques (350, 355).

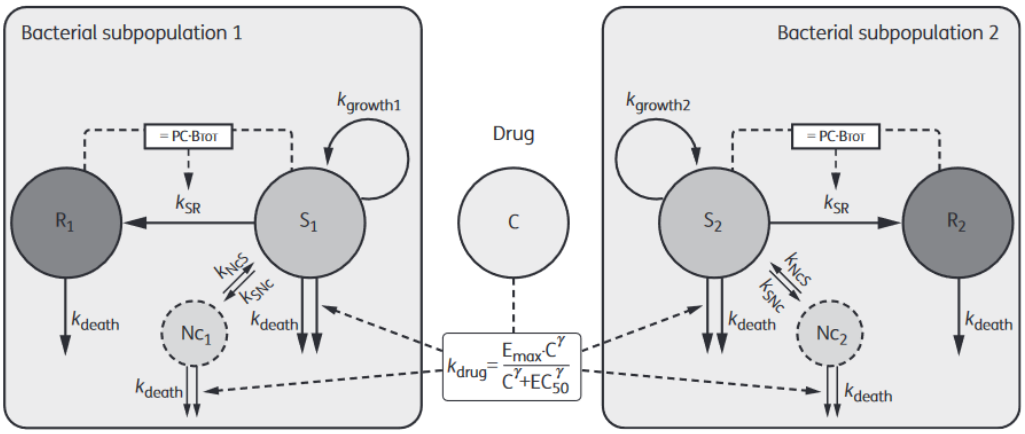


Figure 28: *Schéma du modèle PKPD utilisé par Nielsen et al. pour la caractérisation de l'effet inoculum d'*E. coli *sur l'activité in vitro de la ciprofloxacine (339)*
Abréviation: La population bactérienne totale est divisée en deux sous-populations, une population principale d'origine (1) et une population résistante préexistante (2). C représente la concentration de l'antibiotique, S représente les bactéries en croissance sensible à l'antibiotique, R représente les bactéries résistantes et en quiescence. Nc représente les bactéries sensibles, quiescente et ne formant pas de colonies. k_{growth} est la constante de croissance, k_{death} est la constante de mortalité naturelle, k_{SR} est la constante de transfert entre S et R, k_{SNc} et k_{NcS} sont les constantes de transfert entre S et Nc, et k_{drug} décrit l'effet du médicament. Le transfert de S vers R a été supposé dépendre de la densité bactérienne selon une fonction linéaire avec une constante de proportionnalité (PC) multipliée par le contenu bactérien total du système (BTOT).

Objectif

Face à la multiplication des résistances et au manque de nouveaux antibiotiques, l'utilisation des molécules disponibles doit être optimisée et en particulier leurs schémas posologiques, afin d'augmenter leur efficacité tout en limitant leur toxicité et en réduisant le développement des résistances. Cette optimisation repose sur une meilleure caractérisation de la relation PK et PD. Cependant, les études PK/PD des antibiotiques reposent sur des tests *in vitro* standardisés et réalisés dans des conditions expérimentales peu ou pas transposables à l'environnement *in vivo* ; limitant les extrapolations.

Cette thèse CIFRE, réalisée en collaboration entre le laboratoire INSERM U1070 - PHAR2 (Poitiers, France), l'Institut Roche (Paris, France) et l'entreprise pharmaceutique F. Hoffmann-La Roche (Bâle, Suisse) ; avait pour objectif d'utiliser la modélisation PK/PD semi-mécanistique pour évaluer l'impact des conditions expérimentales *in vitro* traditionnellement standardisées, sur la relation PK/PD de la polymyxine B (PMB) vis-à-vis de plusieurs souches de *Acinetobacter baumannii,* à travers 3 études:

1. Evaluation de l'effet inoculum *in vitro* sur l'activité de la PMB
2. Evaluation de l'impact de la concentration en nutriments du bouillon Mueller-Hinton
3. Evaluation *in vitro* de l'effet potentiel de la mucine sur l'activité de la PMB

Tous ces effets ont été évalués lors d'expériences de TK, et les données ont ensuite été intégrées dans des modèles PK/PD semi-mécanistiques. Par ailleurs, les courbes de bactéricidie pour ce couple bactérie/antibiotique présentent la plupart du temps, un profil bi-phasique avec une décroissance initiale suivie d'une repousse, qui traduisent une diminution de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique. Dans le but d'enrichir la modélisation PK/PD, des analyses de séquençage de génome entier et de transcriptomique ont été réalisées afin d'étudier les mécanismes de résistance potentiellement responsables de ces repousses bactériennes.

Enfin, pour étudier la prédictibilité des modèles PD développés durant ce travail, ces modèles PD *in vitro* ont ensuite été associés à un modèle PBPK, dans le but de simuler l'évolution du nombre de bactéries dans le temps, dans des modèles d'infection murins de la cuisse et du

poumon, traités avec de la PMB. Ces simulations ont ensuite été comparées avec des données observées *in vivo.*

Le schéma de la démarche scientifique suivie dans cette thèse est présenté dans la figure suivante (Figure 29).

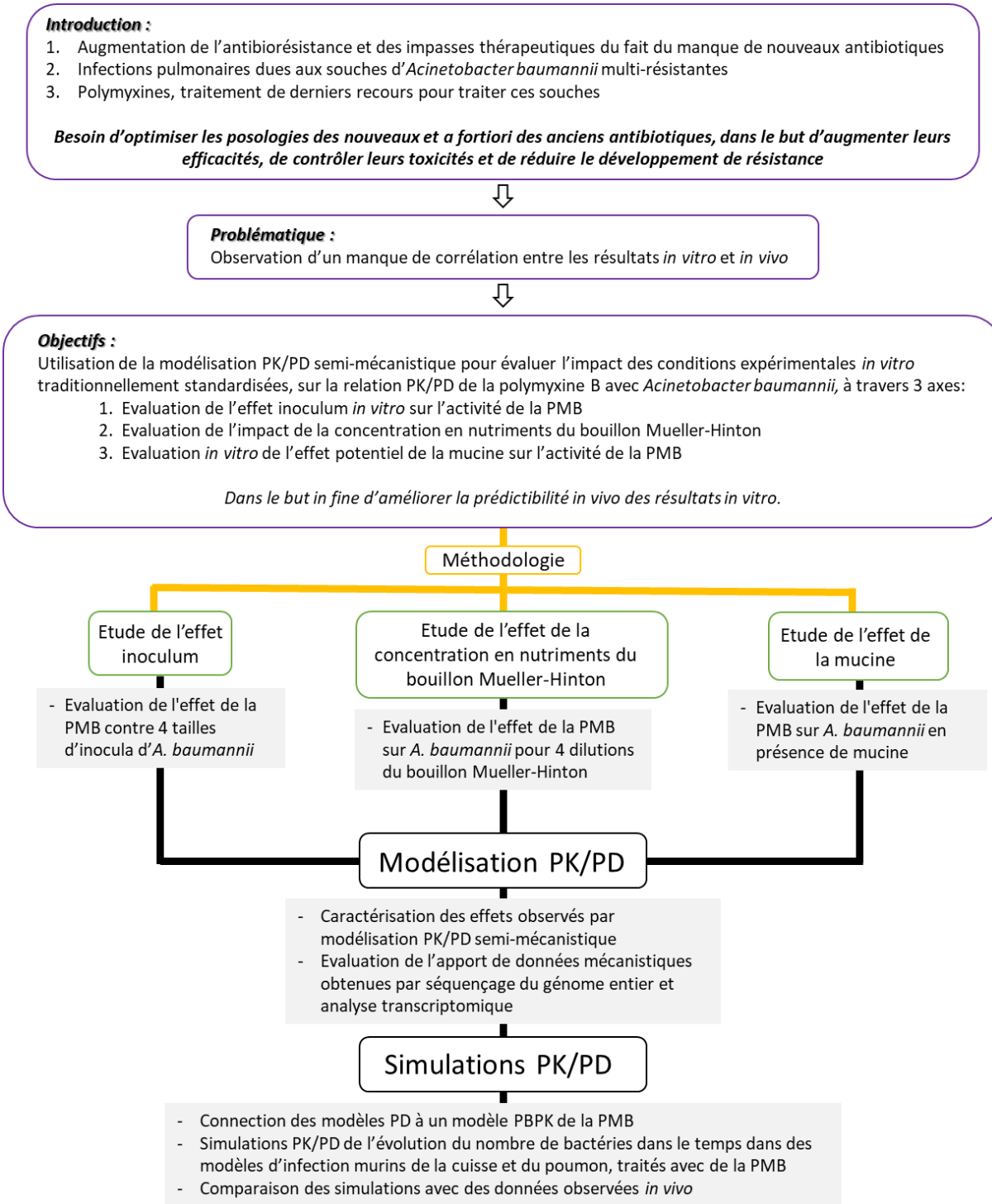


Figure 29: *Démarche scientifique suivie durant cette thèse*

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Article n°1: A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model to Characterize the Inoculum Effect of *Acinetobacter baumannii* on Polymyxin B *In vitro*

Article publié : *Akrong G, Chauzy A, Aranzana-Climent V,* ***Lacroix M****, Deroche L, Prouvensier L, Buyck JM, Couet W, Marchand S. A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model To Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In Vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2022 Jan 18;66(1):e0178921. doi: 10.1128/AAC.01789-21. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34780268; PMCID: PMC8765416.*

Résumé en français :

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 de *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 Emax 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

1. 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.

2. 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).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. 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).

3.2. 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).

3.3. 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.

3.4. 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.

3.5. 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).

3.6. 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.

4. RESULTS

4.1. 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.

4.2. 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.

4.3. 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.

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

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

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:

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

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.

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). 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.

4.4. 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).

5. TABLES & FIGURES

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

Table 2 : Model derived initial killing half-lives (min) at various PMB concentrations and initial inocula						
Inocula (CFU/mL)	**Initial killing half-life (min) at PMB conc. (mg/L) of:**					
	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

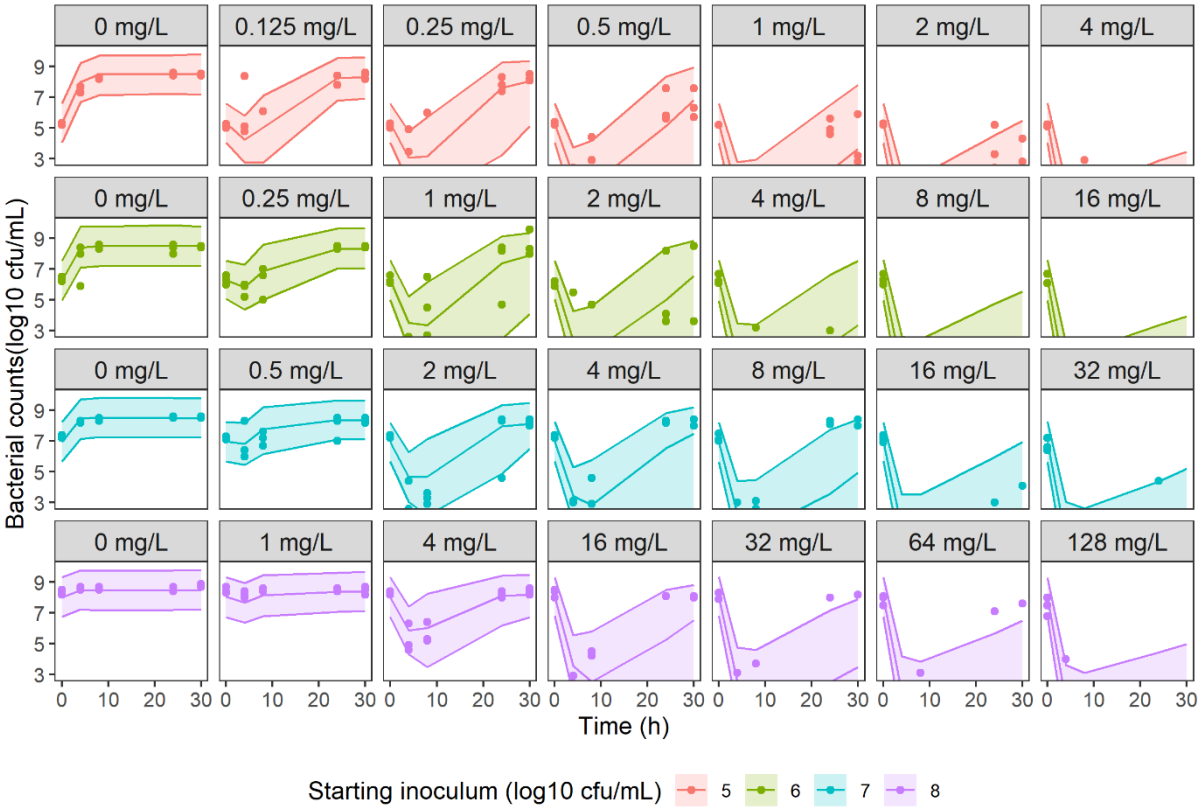


Figure 1: *Visual predictive checks (VPC) for the final model. Circles represent experimental data, solid lines the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1000 simulated profiles.*

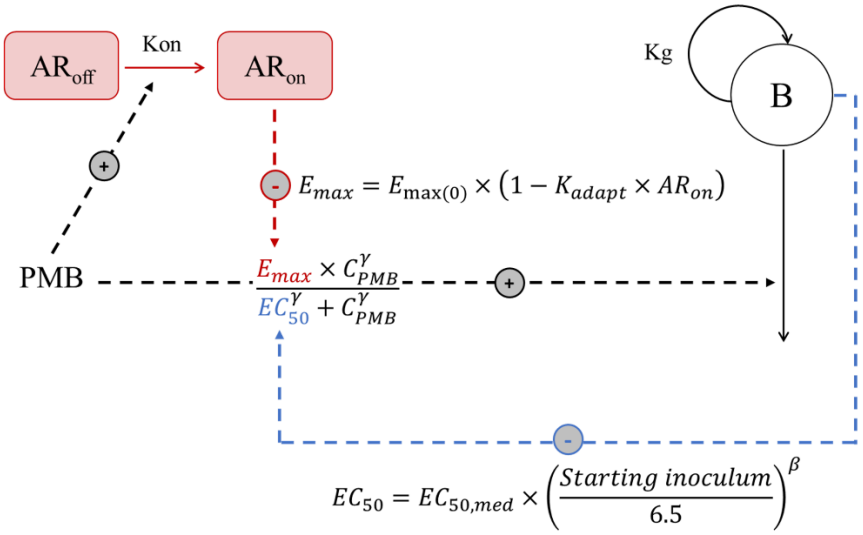


Figure 2 : *Schematic diagram of the PD final model. Bacteria multiplied with a first-order rate constant (Kg) in the bacterial compartment (B). Polymyxin B (PMB) effect K_{PMB}, was modeled according to an E_{max} model. Adaptive resistance (AR) to PMB occurred when bacteria were exposed to PMB according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

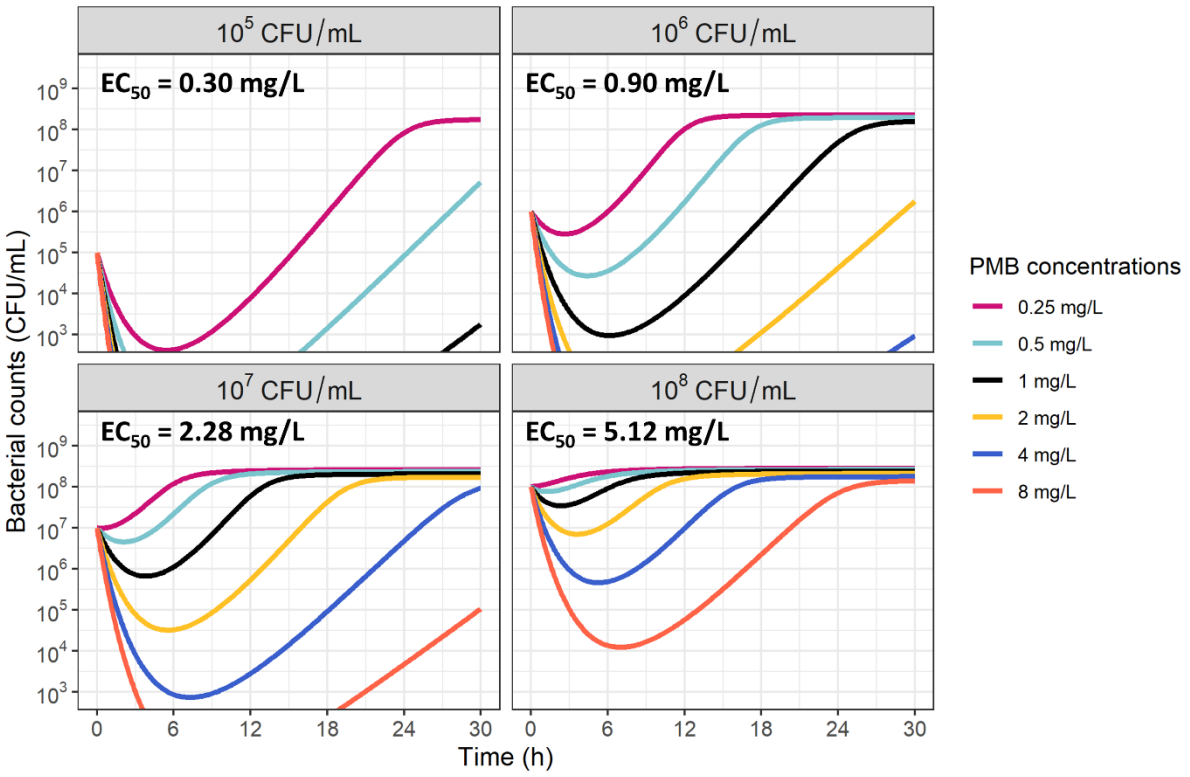


***Figure* 3:** *Simulations of expected bacterial counts (CFU/mL) versus time in presence of various concentrations of PMB (pink: 0.25 mg/L; light blue: 0.5 mg/L; black: 1 mg/L; yellow: 2 mg/L; dark blue: 4 mg/L; and orange: 8 mg/L) for various starting inocula. EC_{50} corresponding to PMB concentration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

6. 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.

7. 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.

8. 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):

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

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:

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

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.

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

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

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.

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

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		

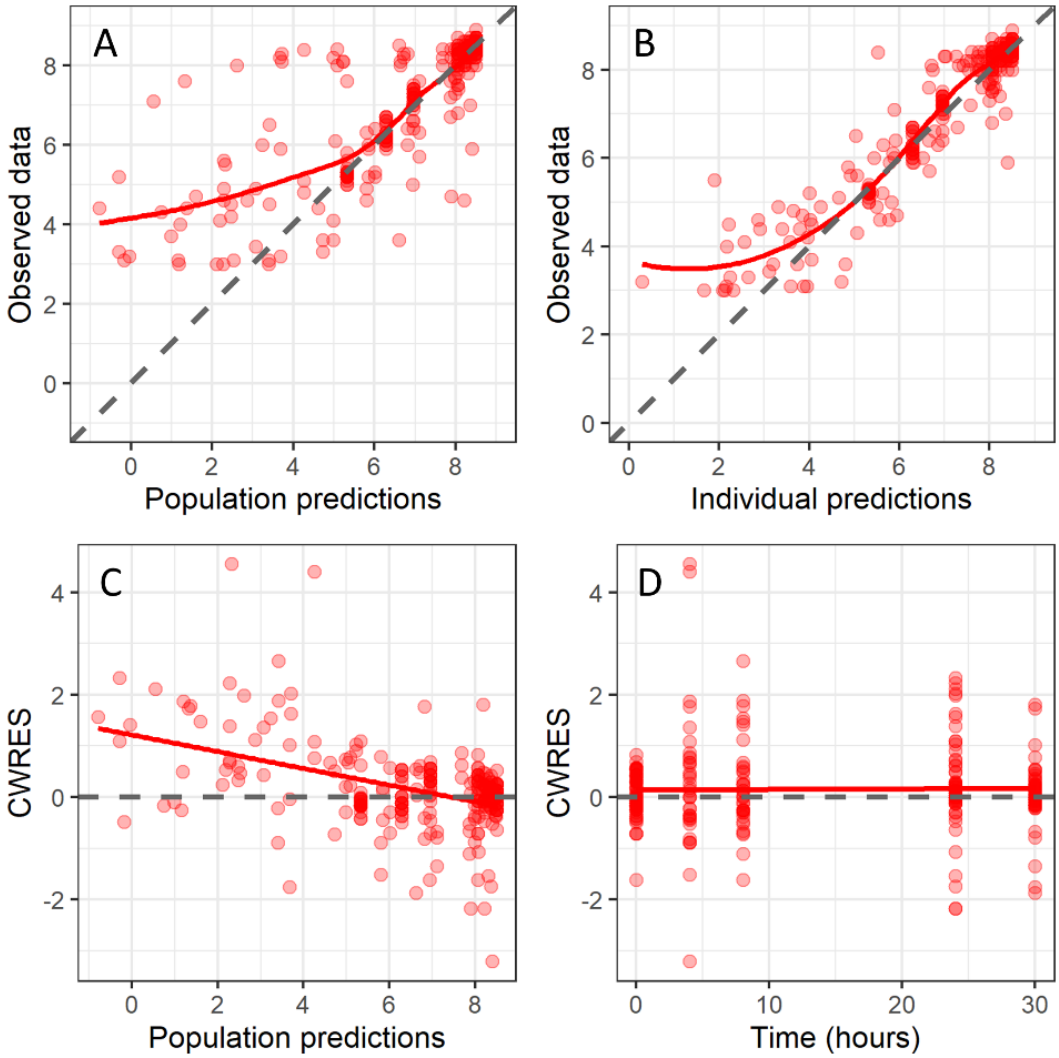


Figure S1: *Goodness of fit plots (GOF) of the final model.* ***A****: observed data versus population predicted bacterial counts.* ***B****: observed data versus individual predicted bacterial counts.* ***C****: conditional weighted residuals (CWRES) versus population predictions.* ***D****: Conditional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

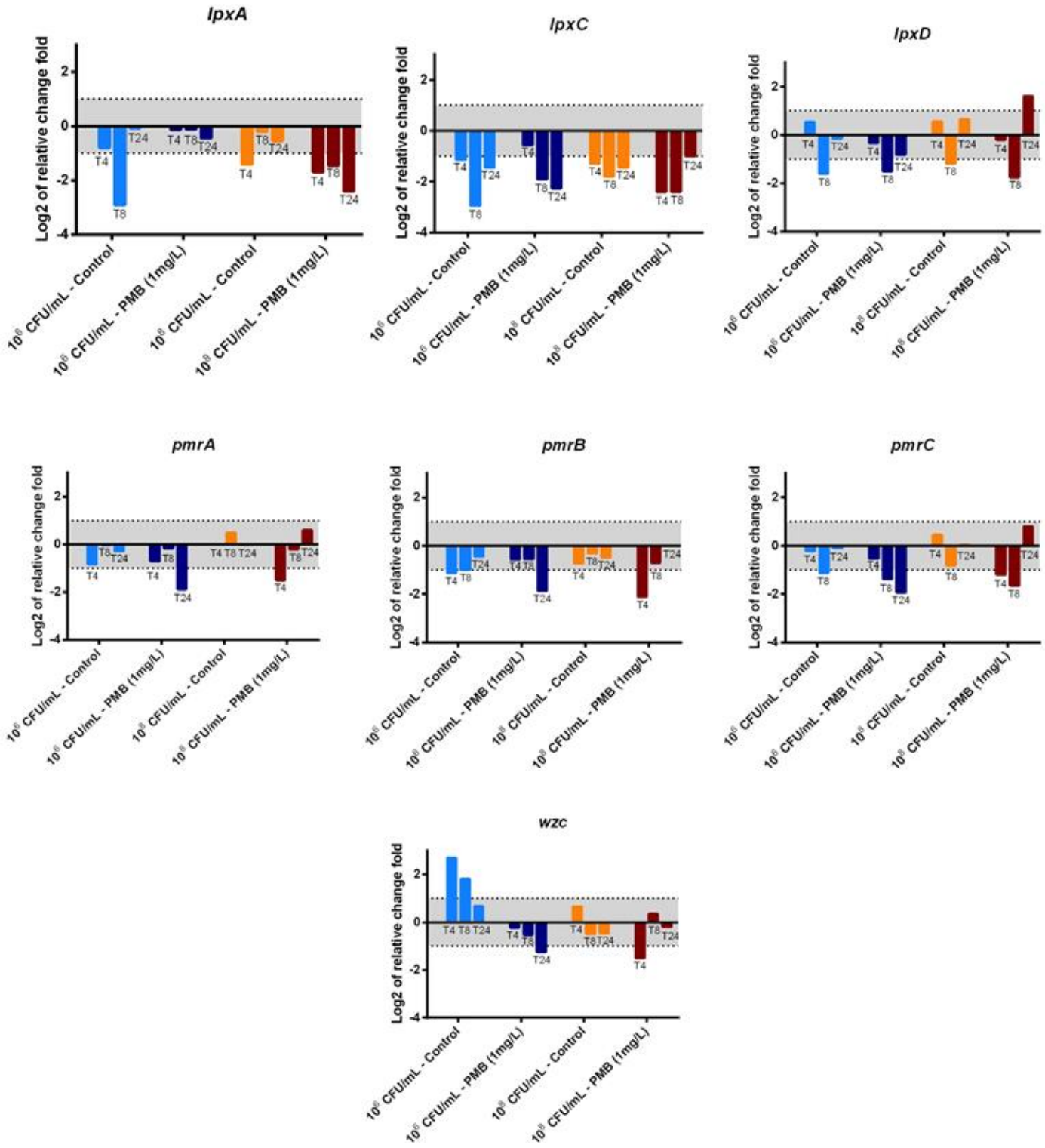


Figure S2: *Relative expression overtime of all the studied genes in A. baumannii CS01 with a starting inoculum of 10^6 and 10^8 CFU/mL with or without PMB 1mg/L. The shaded areas correspond to non-significant relative fold changes*

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.

Article n°2: Impact of nutritional factors on the *in vitro* PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of *Acinetobacter baumannii*

Article soumis : *Mathilde Lacroix, Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy*

Résumé en français :

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet du bouillon Mueller-Hinton enrichi en cations (CAMHB) sur la croissance de trois souches d'*Acinetobacter baumannii*, ATCC 19606 et deux souches cliniques *d'A. baumannii*, sensibles ou résistantes à la polymyxine B (PMB), ainsi que sur l'activité bactéricide de la PMB. Une approche de modélisation pharmacocinétique (PK) / pharmacodynamique (PD) semi-mécanistique a ensuite été utilisée pour caractériser l'effet de la PMB dans diverses conditions.

Des expériences de Time-kill ont été réalisées avec du CAMHB non dilué ou dilué à 50%, 25% et 10%, avec ou sans compensation en Ca^{2+} et Mg^{2+} (connus pour affecter l'activité de la PMB), et avec des concentrations de PMB allant de 0.25 mg/L à 256 mg/L en fonction de la CMI des souches. Pour chaque souche, les réplicas de Time-kill ont été modélisés à l'aide de NONMEM®.

De manière inattendue, la dilution du CAMHB même d'un facteur 10, n'a pas affecté la vitesse de croissance des trois souches en l'absence de PMB. Cependant, l'activité bactéricide de la PMB augmentait avec la dilution du milieu, ce qui se traduisait notamment par une réduction de la repousse bactérienne apparente des différentes souches, observée généralement après quelques heures d'expérience. Les données de chaque souche ont été bien caractérisées par un modèle PK/PD avec deux sous-populations bactériennes ayant une sensibilité différente à la PMB (sensible (S) ou résistante (R)). Une variabilité relativement importante et inexpliquée d'une souche à l'autre a été observée en ce qui concerne l'impact de la dilution du milieu ainsi que la compensation des cations. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour caractériser le mécanisme sous-jacent à cet effet de la dilution du milieu.

Impact of nutritional factors on the *in vitro* PK/PD modelling of polymyxin B against various strains of *Acinetobacter baumannii*

Mathilde Lacroix [1, 2], Jérémy Moreau [2], Claudia Zampaloni [3a], Caterina Bissantz [3b], Hamasseh Shirvani [1], Sandrine Marchand [2, 5], William Couet [2, 5], Alexia Chauzy [2#]

[1] Institut Roche - Boulogne-Billancourt (France)
[2] Université de Poitiers, INSERM U1070, PHAR2 - Poitiers (France)
[3] Roche Pharma Research and Early Development, [a] Immunology, Infectious Disease and Ophthalmology, [b] Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
[5] CHU Poitiers, Département de Pharmacocinétique et Toxicologie - Poitiers (France)

[#] **Corresponding author**:

Alexia CHAUZY

alexia.chauzy@univ-poitiers.fr

INSERM U1070 - Université de Poitiers

Pôle Biologie Santé - Bâtiment B36

1 rue Georges Bonnet

86022 POITIERS Cedex, France

1. ABSTRACT

The main objective of this study was to assess the effect of enriched artificial cation adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB), on the growth of three *Acinetobacter baumannii* strains, ATCC 19606 and two clinical *A. baumannii* strains, either susceptible or resistant to polymyxin B (PMB), and on the PMB bactericidal activity. A semi-mechanistic pharmacokinetic (PK) / pharmacodynamic (PD) modelling approach was then used to characterize the effect of PMB in various conditions.

Time-kill experiments were performed using undiluted CAMHB or diluted at 50%, 25% and 10%, with or without Ca^{2+} and Mg^{2+} compensation (known to affect PMB activity), and with PMB concentrations ranging from 0.25 mg/L to 256 mg/L based on the strain's MIC. For each strain, time-kill replicates were modelled using NONMEM®.

Unexpectedly, CAMHB dilution by up to 10-fold did not affect the growth rate of any of the three strains in the absence of PMB. Yet, PMB bactericidal activity increased with medium dilution resulting in particular in a reduction of the apparent bacterial regrowth of the various strains observed typically after few hours of experiment. The data of each strain were well characterised by a PK/PD model with two bacterial sub-populations with different susceptibility to PMB (susceptible (S) or resistant (R)). Relatively large, unexplained strain-to-strain variability was observed regarding the impact of medium dilution as well as cation compensation. Complementary experiments are needed to characterise the mechanism underlying this medium dilution effect.

Keywords: *A. baumannii*, Polymyxin B, semi-mechanistic PK/PD modelling, cations, CAMHB dilution effect

2. INTRODUCTION

Optimisation of antibiotics dosing regimens most often relies on pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) indices, such as maximal unbound drug concentration over MIC [*f*Cmax/MIC], percentage of time period that drug concentration is above the MIC [%*f*T>MIC], or area under the unbound drug concentration-time curve over MIC [*f*AUC/MIC]. However, these indices suffer from several limitations [1] and more sophisticated approaches to capture the complexity of antibiotic-bacteria interactions, such as semi-mechanistic or mechanistic PK/PD modelling [2], are increasingly reported in the literature [3].

However, although those new approaches are scientifically highly interesting, they are often based on *in vitro* experiments such as time-kill (TK) or Hollow Fiber Infection Model (HFIM), which might not directly translate to *in vivo*. Indeed, linking *in vitro* PD models with *in vivo* PK to predict *in vivo* outcomes via Monte-Carlo simulations, has been reported but a lack of correlation between predictions based on *in vitro* models and *in vivo* data was often observed [4–11]. To predict *in vivo* data from *in vitro* PD models combined with *in vivo* PK, some model parameters, related to antibiotic activity [6] or both to the activity and bacterial growth [4,5,8,9,11], or even the model structure [7,10] had to be refined. Several reasons can contribute to this lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* data including specific *in vivo* aspects such as host defences, or the presence of biofilm which are most often not taken into account *in vitro*, with a few exceptions [12,13]. On the other hand, the culture media used *in vitro* may not reflect the environment of the bacteria at the infection site. Indeed bacteria evolve in different and complex micro-environments where nutrients availability can differ with pathophysiological conditions, as inflammation is known to increase carbon source, amino acids, vitamins and iron at the action site [14] or between different infection sites. For example, bacteria responsible of intracellular infections have access to an important source of nutrients [15], likewise in lung infection where biofilms are present [16] while nutrients are less abundant in cerebrospinal fluid [17] or in urinary tract infections [18]. Although culture media are occasionally selected to mimic body fluids such as CSF [19] or peritoneal fluids [20], most often rich artificial media are used for their ability to promote bacterial growth, which does not necessarily reflect *in vivo* conditions where bacteria growth rate was found to be higher *in vitro* compared to *in vivo* [5,21]. Among *in vitro* culture media, cation adjusted

Mueller-Hinton broth (CAMHB) has been preferentially used over years and is recognized nowadays as a standard by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [22,23]. A previous study has investigated the effect of nutrients concentration via CAMHB dilutions on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 growth and meropenem antimicrobial activity [24]. The results showed a decrease of bacterial growth rate, an increase of kill rate, and also a decrease of meropenem MIC with medium dilutions. In addition to nutrients, cations present in CAMHB could have an impact on the activity of antibiotics such as polymyxins by displacing them from binding to lipopolysaccharide (LPS) on the outer membrane of bacteria [25].

The aim of the present study was to investigate the effect of nutrient concentration and cations present in CAMHB on another couple of bacteria/antibiotic - *Acinetobacter baumannii*/polymyxin B - for which discrepancies between *in vitro* and *in vivo* have been previously observed [10], by using a PK/PD modelling approach distinguishing the medium effect on the bacterial growth, the initial CFU decrease and the regrowth.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Chemical and strains

Polymyxin B (PMB) was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and used to prepare stock solutions of 10 mg/mL in sterile water. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and two clinical multi-drug resistant (MDR) strains of *A. baumannii*, isolated from a patient before (AB121-D0) and 12 days after treatment with colistin (AB122-D12) [26], were used during this study. AB121-D0 was susceptible to PMB while AB122-D12 became resistant.

3.2. MIC determination

MICs of the three *A. baumannii* strains were determined at least in duplicates by micro-dilution according to EUCAST and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations [22,23] in commercial cation adjusted Mueller-Hinton broth II (CAMHB-

100%) (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) or diluted in water at 1:2 (CAMHB-50%), 1:4 (CAMHB-25%) or 1:10 (CAMHB-10%) with or without cations compensation to reach CAMHB-100% level.

3.3. Time-kill experiments with various dilutions of CAMHB

The three strains were cultured overnight in CAMHB-100% under shaking (150–170 rpm) at 35°C. Then these cultures were diluted to 1/50 in CAMHB-100%, and incubated at 35°C under shaking until an optical density (OD) of 0.3 (corresponding to 1.10^8 CFU/mL of bacteria in exponential growth phase) was achieved. The bacterial pre-cultures were then diluted in order to obtain a starting inoculum at 1.10^6 CFU/mL in CAMHB-100% or diluted at 50%, 25% and 10%. TK experiments were performed with PMB concentrations range including MICs values and ranging from 0.125 mg/L to 256 mg/L. Drug-free CAMHB was used as a bacterial growth control for each CAMHB dilution and strain. These cultures were incubated at 35°C and bacteria samples were collected over time at T0h, T1h, T3h, T6h, T10h, T24h and T30h. Samples were serially diluted in NaCl 0.9% and plated onto Mueller-Hinton agar supplemented with 1% activated charcoal (to prevent PMB carry-over effect). Bacteria were counted after overnight incubation at 35°C. The limit of quantification was 400 CFU/mL (i.e. 2.6 $\log_{10}$ CFU/mL). Experiments were conducted in triplicate for the three *A. baumannii* strains and each CAMHB dilution.

3.4. Time-kill experiments with CAMHB dilutions and cations compensation

Additional TK experiments were performed in triplicate with the three *A. baumannii* strains following the same protocol as described above but with cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) compensation in diluted CAMHB in order to restore the concentrations found in CAMHB-100% (i.e. 20-25 mg/L of calcium and 10-12.5 mg/L of magnesium) [27]. PMB concentrations ranged between 0.25 and 64 mg/L depending of the strain's MIC.

3.5. Pharmacodynamic model

Bacterial counts obtained from TK experiments without cations compensation were first modelled using NONMEM 7.4 (ICON plc, Dublin, Ireland) with the Laplacian algorithm and the M3 method for handling observations below the limit of quantification [28]. For each strain, TK replicates obtained for all CAMHB dilutions (without cations compensation) were modelled simultaneously. PMB was assumed to be stable over the course of the experiment as previously shown [29]. A previously described semi-mechanistic model with hetero-resistance [30], i.e. two bacterial sub-populations with S representing the susceptible and R the resistant bacterial sub-populations to PMB, was used to describe the time course of bacterial counts (CFU/mL) for the three *A. baumannii* strains (Figure 1). Briefly, a logistic growth model with one compartment for each bacterial sub-population was used to describe the self-limited bacterial growth in absence of antibiotic (Equations 1 and 2).

$$\frac{dS}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times S \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times R \quad \text{(Eq. 2)}$$

Where k_{net} (h^{-1}) is the apparent growth rate constant and BMAX (CFU/mL) is the maximal capacity of the system.

A PMB effect on bacterial killing (Kill rate) was characterized by a sigmoidal Emax model (Equation 3), where Emax (h^{-1}) represents the maximum kill rate, EC_{50} (mg/L) the PMB concentration needed to reach 50% of the maximum effect, C (mg/L) the PMB concentration and γ to the Hill coefficient. PMB affected both sub-populations but differences in Emax, EC_{50} or both were tested, to characterize the difference in PMB susceptibility between S and R. PMB kill rate was incorporated into Equations 1 and 2, as described in Equations 4 and 5.

$$Kill\ rate = \frac{Emax \times C^{\gamma}}{EC_{50}{}^{\gamma} + C^{\gamma}} \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$\frac{dS}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times S - Kill\ rate_S \times S \quad \text{(Eq. 4)}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times R - Kill\ rate_R \times R \quad \text{(Eq. 5)}$$

Where Kill $rate_S$ and Kill $rate_R$ (h^{-1}) are the killing rates of S and R respectively.

For each strain, the impact of CAMHB dilution on bacterial growth rate and killing rate due to PMB was investigated by estimating separate parameters for each dilution. Parameters affected by CAMHB dilution were then re-estimated using TK data obtained with cations compensation, while keeping the other parameters fixed. In the final model, parameters for both TK data with and without cations compensation were estimated simultaneously.

Model selection was based on objective function value (OFV), relative standard errors (RSEs) of the parameter estimates obtained using the sampling importance resampling (SIR) procedure implemented in PsN [31] and goodness of fit (GOF) plots. Visual predictive checks (VPCs) with stratification on PMB concentration, CAMHB dilution and cations compensation 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 1,000 replicates of the original data set. The concordance between simulations and observations was inspected visually.

3.6. Simulation of bacterial killing rate at different PMB concentrations

To compare the impact of CAMHB dilution with and without cations compensation between the three *A. baumannii* strains, simulations of expected PMB kill rate (Equation 3) for both S and R sub-populations at constant PMB concentrations ranging from 0 to 1000 mg/L were performed with R software (version 4.1.3).

4. RESULTS

4.1. Medium effect on MIC

Using CAMHB-100%, PMB MIC was estimated at 0.25 mg/L for ATCC 19606 and 0.5 mg/L for AB121-D0, with only minor effect of CAMHB dilution without or with cations compensation (Table 1). For AB122-D12, the MIC was assessed at 128 mg/L in CAMHB-100% with major reduction after medium dilution (MIC = 2 mg/L with CAMHB-10%) as shown in Table 1. Cations compensation decreased the MIC reduction observed with medium dilution (MIC = 32 mg/L with CAMHB-10% with cations compensated).

4.2. TK results with CAMHB dilutions

No dilution effect was observed on apparent bacterial growth in the absence of antibiotic for the three *A. baumannii* strains (Figure S1 - first column).

For ATCC 19606, regrowth was observed after an initial CFU decay for PMB concentrations up to 16mg/L corresponding to 64-fold the MIC in CAMHB-100% (Figure S1-A). The CAMHB dilution had a minimal impact for PMB concentrations below and around MIC, but beyond that bacterial regrowth became less apparent with dilution. Indeed, the highest PMB concentration for which regrowth was observed, decreased from 16 mg/L with CAMHB-100% to 1 mg/L with CAMHB-10%.

For AB121-D0, comparable results with ATCC 19606 have been observed (Figure S1-B) with also a decrease of the highest PMB concentration showing regrowth, from 16 mg/L in CAMHB-100% to 2 mg/L in CAMHB-10%.

For AB122-D12, in CAMHB-100% and in presence of PMB, bacterial regrowth was observed for concentrations up to 128 mg/L (Figure S1-C). However, CAMHB dilution had a more pronounced effect on this strain, with a 64-fold reduction of the highest concentration showing regrowth between CAMHB-100% and CAMHB-10% (128 versus 2 mg/L).

4.3. Time-kill experiments with CAMHB dilutions and cations compensation

For ATCC 19606, TK performed with cations compensation in the diluted medium conditions (50%, 25% and 10%) revealed similar results when compared with the data of this strain obtained without compensation (Figure S2-A).

For AB121-D0, when cations were compensated, comparable results were obtained between CAMHB-50%, 25% and 10%, suppressing medium dilution effect. These combined results were similar with CAMHB-100% despite an important variability between replicates (Figure S2-B).

For AB122-D12, the cations compensation reduced medium dilution effect but, did not allow to restore CAMHB-100% results. For a same PMB concentration, a more important CFU decrease was observed in diluted medium compensated with cations compared to CAMHB-100% (Figure S2-C).

4.4. PK/PD modelling of the medium dilution effect

The selected PK/PD models described well the TK data, as shown on GOF plots available in supplemental materials (Figure S3) and on visual predictive checks (VPC) on Figures 2 and S4. For ATCC 19606 and AB121-D0, the PMB effect parameters Emax and EC_{50} were different for each bacteria sub-population while for AB122-D12, only Emax differed between sub-populations (Figure 1).

4.4.1. Effect of CAMHB dilution on model parameters

Regarding ATCC 19606, the dilution effect was observed only for the R sub-population. The CAMHB dilution had a moderate impact on $Emax_R$ with a 2.15-fold increase of this parameter between CAMHB-100% and 10% (Table S1-A & Figure S5). For this strain, similar $Emax_R$ values were estimated for TK with and without cation compensation, except for CAMHB-50% exhibiting a modest (1.15-fold) increase between data with and without cations compensation.

For the clinical strain AB121-D0, a dilution effect was identified on parameters describing PMB activity only for R sub-population as for ATCC 19606. However, in addition to an effect on $Emax_R$, CAMHB dilutions also impacted the EC_{50R}, for which a 3.8-fold increase was observed between CAMHB-100% and 10% (Table S1-B & Figure S5). With cations compensation, EC_{50R} still increased with medium dilutions (EC_{50R} in CAMHB-10% with cations ~5-fold the value of CAMHB-100%), whereas $Emax_R$ values remained similar to CAMHB-100% value (less than 13% differences between values).

For the AB122-D12, the CAMHB dilution effect was characterized on both S and R sub-populations by a 98% decrease of EC_{50} between CAMHB-100% and 10%, this parameter being common to both S and R sub-populations (values were respectively for CAMHB-100% and 10% : 60.4 and 1.13 mg/L) (Table S1-C & Figure S5). No additional medium effect was characterized on $Emax_R$ unlike ATCC 19606 and AB121-D0, or on $Emax_S$. After cations compensation, EC_{50} was also decreasing with medium dilution but to a lesser extent (EC_{50} values in CAMHB-100% 60.4 mg/L, in CAMHB-10% with cations compensated: 7.2 instead of 1.13 mg/L without compensation).

4.4.2. Dilution effect on PMB kill rate

Simulations of the expected kill rates for various PMB concentrations and different CAMHB dilutions with and without cations compensation are shown on Figures 3, 4 and S6.

Regarding ATCC 19606, for the S sub-population, kill rate increased with PMB concentration before reaching a plateau at 12.1 h^{-1}, and was not impacted by CAMHB dilutions. For R sub-population, kill rate values still increase with PMB concentrations but also with the different CAMHB dilutions. Plateau value also increased with CAMHB dilutions and reached $Emax_R$ values: 1.61 and 3.79 h^{-1} respectively for CAMHB-100% and 10%. Cations compensation did not impact kill rate values (Figures 4 and S6).

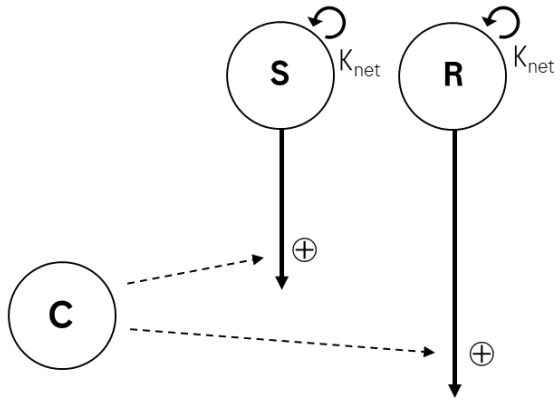
For AB121-D0, kill rate increased with PMB concentration until a plateau value, and only the R sub-population was impacted by CAMHB dilutions. However, for this strain, the dilution impact on kill $rate_R$ varied with PMB concentration (Figure 3). For PMB concentrations below approximately 3 mg/L, PMB kill rates were higher in CAMHB-100% and 50% than in CAMHB-25% and 10% (e.g. at PMB = 1 mg/L, Kill $rate_{100\%}$~1.40 h^{-1} and Kill $rate_{10\%}$~1.08 h^{-1}) (Figures 4 and S6). However, above 3 mg/L, the kill $rate_R$ was higher in diluted medium with, plateau values equivalent to 1.87 and 3.04 h^{-1} for CAMHB-100% and 10% respectively. With cations compensation, maximum kill $rate_R$ values were reduced (at 10 mg/L values for CAMHB-50%, 25% and 10% were respectively reduced of approximately 38%, 21% and 20% compared with values without compensation) and kill $rate_R$ values of CAMHB-50%, 25% and 10% recovered values similar to CAMHB-100% (Figures 4 and S6).

For AB122-D12, kill rates for both S and R sub-populations were impacted by medium dilution and followed sigmoidal profiles (Figure 3). For S sub-population, medium dilution did not modified the maximum value (equivalent to 21.90 h^{-1}), but decreased the concentration needed to reach it, which translated with a shift to the left related to the degree of CAMHB dilution, corresponding to EC_{50} decrease between CAMHB-100% and 10% (Table S1). Similar results were observed for R sub-population with a maximum kill rate value of 2.99 h^{-1}. When cations were compensated in medium, the observed shift to the left of kill rate curves for both S and R sub-populations was reduced (Figures 4 and S6).

5. TABLE & FIGURES

Table 1: MIC values in diluted CAMHB with (w/) and without (w/o) cations compensation

MIC [mg/L]	ATCC 19606		AB121-D0		AB122-D12	
	w/	w/o	w/	w/o	w/	w/o
CAMHB-100%	0.25		0.5		128	
CAMHB-50%	0.5	0.25	0.5	0.5	128	64
CAMHB-25%	0.5	0.5	1	1	64	16
CAMHB-10%	1	1	2	2	32	2



ATCC 19606	AB121-D0	AB122-D12
$Kill\ rate_S = \frac{Emax_S \times C^\gamma}{EC_{50_S}{}^\gamma + C^\gamma}$	$Kill\ rate_S = \frac{Emax_S \times C^\gamma}{EC_{50_S}{}^\gamma + C^\gamma}$	$Kill\ rate_S = \frac{Emax_S \times C^\gamma}{\boldsymbol{EC_{50}}^\gamma + C^\gamma}$
$Kill\ rate_R = \frac{\boldsymbol{Emax_R} \times C^\gamma}{EC_{50_R}{}^\gamma + C^\gamma}$	$Kill\ rate_R = \frac{\boldsymbol{Emax_R} \times C^\gamma}{\boldsymbol{EC_{50_R}}^\gamma + C^\gamma}$	$Kill\ rate_R = \frac{Emax_R \times C^\gamma}{\boldsymbol{EC_{50}}^\gamma + C^\gamma}$

Figure 1: *PK/PD models structure for the three strains. K_{net}: apparent growth rate constant (h^{-1}). S: susceptible bacterial sub-population. R: resistant bacterial sub-population. C: polymyxin B concentration (mg/L). Emax: maximum kill rate constant due to PMB (h^{-1}). EC_{50}: PMB concentration needed to reach 50% of Emax (mg/L). γ: Hill coefficient. Medium effect was applied on $Emax_R$ for ATCC 19606, $Emax_R$ and EC_{50R} for AB121-D0 and on EC_{50} common to both bacterial subppulations for AB122-D12.*

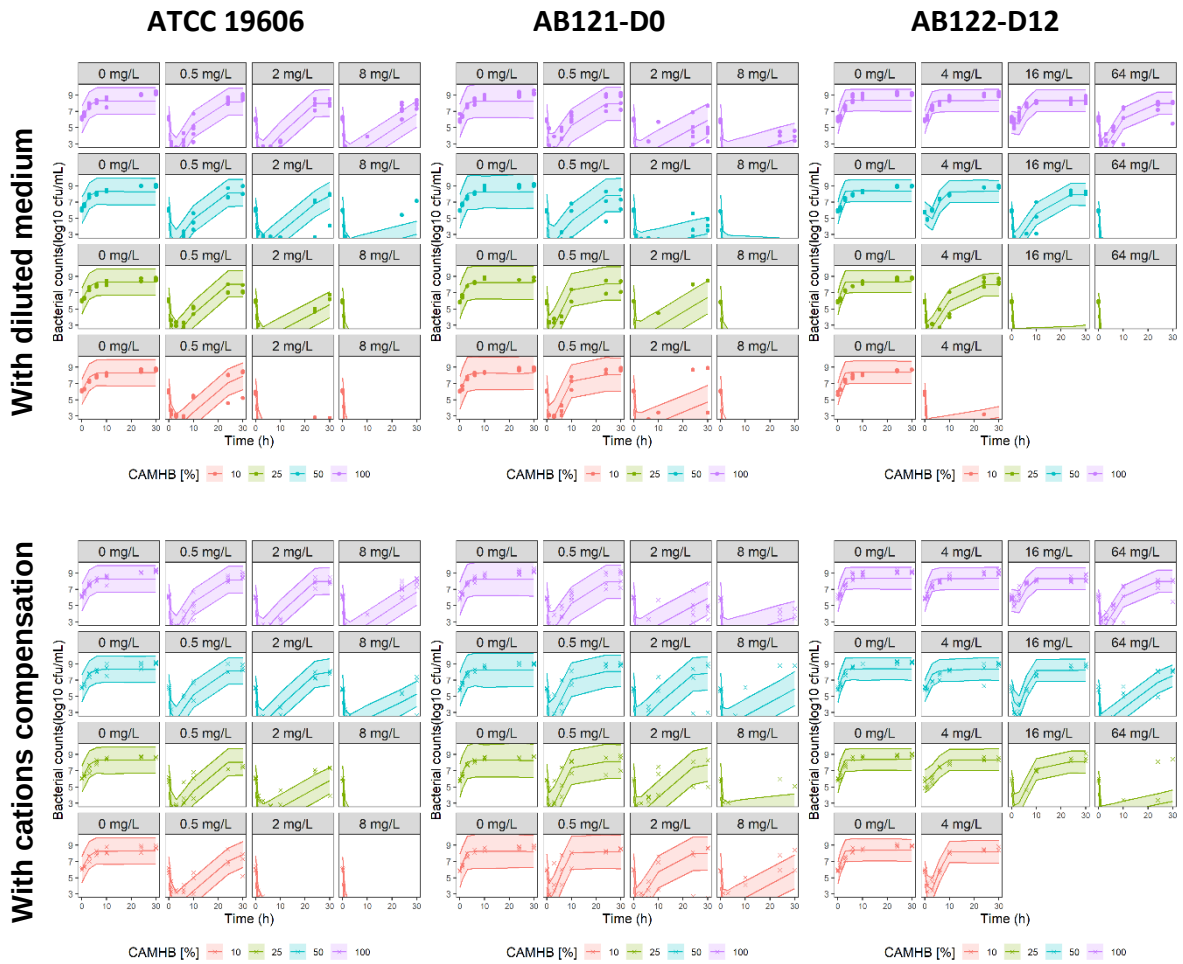


Figure 2: *Visual predictive check for selected TK PMB concentrations. Circles represent experimental data with cations diluted and crosses with cations compensation, solid lines depict the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1,000 simulated profiles.*

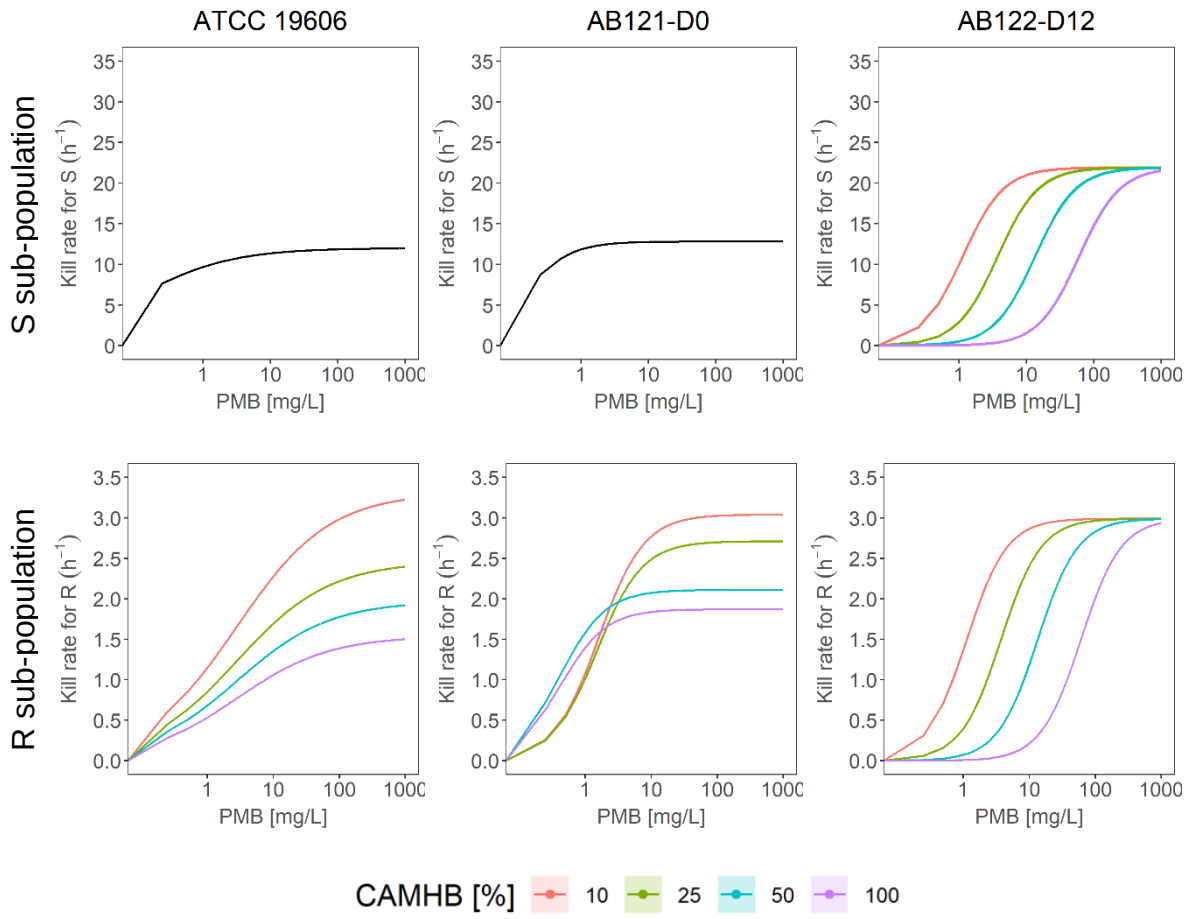


Figure 3: *Simulation of PMB kill rate versus PMB concentrations for various CAMHB dilutions. Black curves corresponded to kill rate not influenced by CAMHB dilutions.*

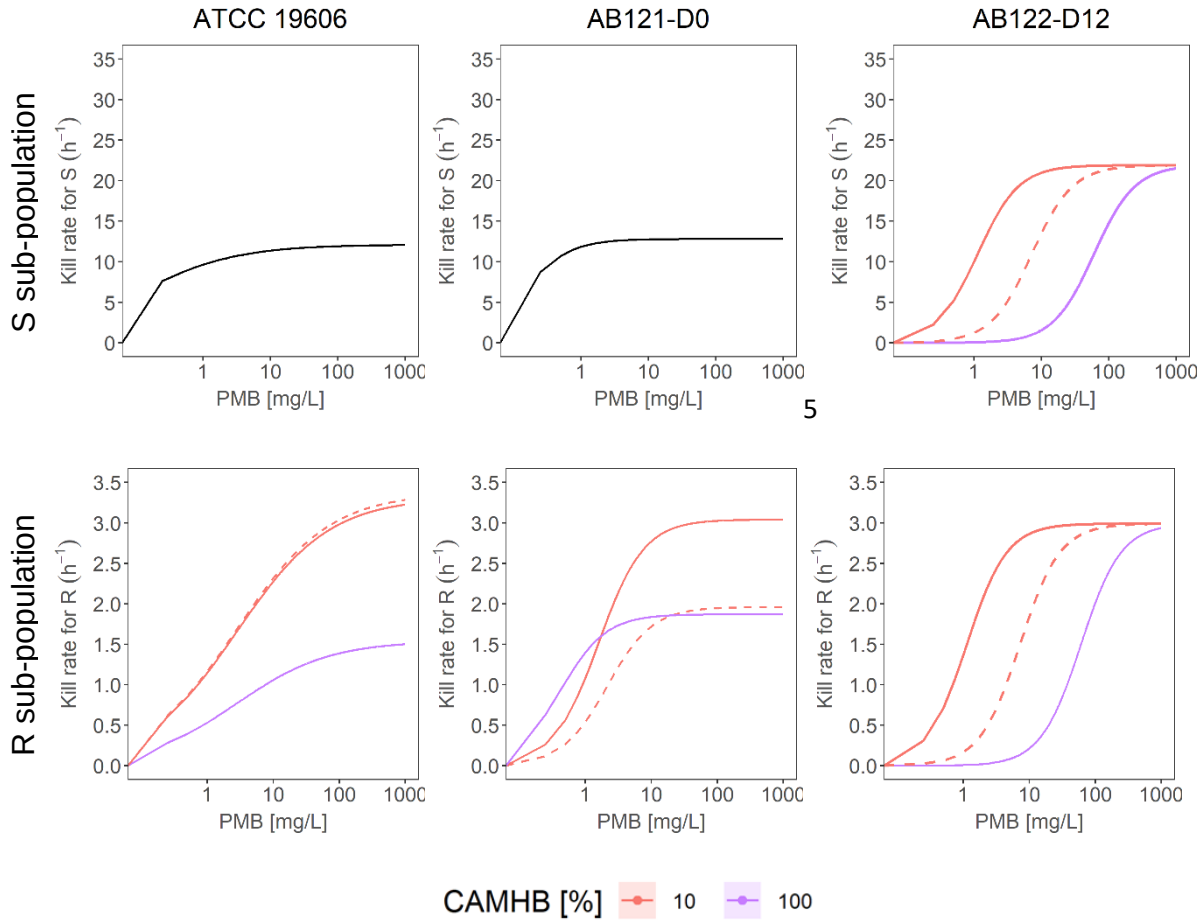


Figure 4: *Simulation of PMB kill rate versus PMB concentrations for CAMHB-100% and 10% with and without cations compensation. Black curves corresponded to kill rate not influenced by CAMHB dilutions. Solid lines depicted data with diluted media without cations compensation and dashed lines depicted the data with.*

6. DISCUSSION

One of the first results of this study was that although artificial *in vitro* culture media have been developed to promote bacterial growth, CAMHB-100% dilution by up to 10-fold did not affect the growth rate of the three *A. baumannii* strains in the absence of antibiotic, confirming previous results for this species [32]. Another study has shown that medium dilution lead to an increase of the initial *P. aeruginosa* CFU decay with time in the presence of meropenem, and regrowth was observed but not characterized [24]. However, in our hands, the initial CFU decrease with time was too rapid for precise characterization and assessment of a medium dilution effect, except for AB122-D12. Yet medium dilution progressively reduced the apparent bacterial regrowth of the various strains. For ATCC 19606 and AB121-D0, no medium dilution effect was observed for S sub-population and only a modest impact on the kill rate for R sub-population with an increase by less than a factor of 2 between the values at CAMHB-100% and 10% was observed (Figure 2). In contrast, for AB122-D12, both the kill rates for S and R sub-populations were dramatically increased by up to almost 100-fold in CAMHB-10% (Table S1).

Cations being known to interfere with PMB activity by displacing the antibiotic of its binding sites [25], complementary experiments with adjusted Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations were conducted and showed again a wide strain-to-strain variability. No effect of cations compensation was observed for ATCC 19606. For AB121-D0, cations compensation tended to suppress the medium dilution effect with important variability between experiments. And for AB122-D12, cations compensation attenuates the medium dilution effect, indicating that cations dilution explains only part of the kill rate increase with CAMHB dilution (Figure 4). However, if the impact of Ca^{2+} or Mg^{2+} has been assessed, other cations (Mn^{2+}, Zn^{2+}, etc.) could bind to lipid A and contribute to the medium dilution effect. An effect of Fe^{2+} seems less likely since we did not observe the effect of changing Fe^{2+} concentrations on *A. baumannii* growth previously reported [33].

The mechanistic explanation of this medium dilution effect remains unclear and would necessitate further studies to understand the impact of the depleted media on bacteria metabolism and/or on the compound activity. The resistant strain AB122-D12 carries a 10 amino acids insertion in *pmrB*, which is absent in ATCC 19606 and AB121-D0, and known to

confer polymyxins resistance through constitutive eptA expression reducing the overall net-negative charge of the membrane by a lipid A modification [34]. If the direct link between its mutation and the reinforced medium effect observed for AB122-D12 remains challenging to established, it cannot be completely excluded as it remains the main difference between the strains. Therefore, It would be also warranted to test other *A. baumannii* strains with other phenotypes as for example strains carrying mcr-1 plasmid known to bring polymyxin resistance [34].

The PK/PD modelling approach based on TK allowed to differentiate between the impact of the dilution on bacterial growth, killing kinetics as well as on regrowth and resistance development over all the experiment time course which cannot be achieved by traditional PK/PD indices based on MIC. However, a major strain-to-strain variability has been observed in this study, with unfortunately no obvious explanation precluding predictions for any other strain, which strongly limits the scope of this work. It should be reminded that the semi-mechanistic PK/PD model with hetero-resistance used in this study remains essentially a mathematical tool to characterize an observed reduced bacteria sensitivity with time in the presence of antibiotic, and is probably too simplistic by only considering two homogenous sub-populations: with initially a majority of susceptible bacteria (S) leading to the initial CFU decay observed during TK experiments, and then resistant bacteria (R) developing to become dominating with time and responsible for bacterial regrowth. Moreover, although the PD model structure with adaptation was not able to fit the data, it cannot be excluded that adaptation mechanisms could be responsible of bacterial regrowth as previously assessed with transcriptomics studies [35]. There is therefore an increase need of more mechanistic information in order to better characterize *in vitro* data.

While *in vitro* experiments allow more experimental freedom to understand biological mechanisms, it is however, worthy to wonder if those mechanisms will subsequently translate to *in vivo*. First, while the standardized commercial culture media used cannot be directly related to *in vivo* environments regarding nutrients composition, this study has shown that the medium has a considerable impact on compound bactericidal activity even for PMB concentrations that can be found in patients (below 10 mg/L [36]). Moreover, in this study, the Ca^{2+} and Mg^{2+} compensation demonstrated to be partially responsible of the medium dilution effect observed, but the compensation was done in order to restore the cations

concentrations of the commercial CAMHB-100%, which however remain 2 to 3–fold lower than those found in plasma or in the extracellular space [37,38]. It is also relevant to highlight that *in vivo* results cannot be systematically reproduced during *in vitro* experiments. For example, the mutation of AB122-D12 in *pmrB* obtained in the patient, may be observed but not systematically during *in vitro* experiments, and therefore AB122-D12 cannot be considered as direct AB121-D0 R subpopulation representative. Furthermore, although relatively popular, the PK/PD model structure used in this study remains a simplification of biological reality, and the significance given to bacterial sub-populations as well as the interpretation of modelling results must be taken with caution. Consequently, in order to improve correlation between *in vitro* and *in vivo*, there is a need to reduce the distance between *in vitro* and *in vivo* conditions and to bring the *in vitro* experimental conditions closer to *in vivo* environment, in order to assess antibiotics efficacy in relevant testing conditions established in regards to the final purpose.

Results of this study indicate that it is to some extent possible to adjust the *in vitro* medium to better capture *in vivo* efficacy but open questions remain including the reason of isolate specific differences in the *in vitro-in vivo* translation. Therefore, further explorations are warranted.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Agnès Audurier and Laure Prouvensier for their technical assistance and Vincent Aranzana-Climent for his advices in modelling.

FUNDING

Mathilde Lacroix received a CIFRE fellowship founded in part by National Association for Research and Technology (ANRT), on the behalf of the French Ministry of Higher Education and Research, and in part by Institut Roche

7. REFERENCES

[1] Landersdorfer CB, Nation RL. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. Front Pharmacol 2021;12:770518. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.770518.

[2] Nielsen EI, Friberg LE. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol Rev 2013;65:1053–90. https://doi.org/10.1124/pr.111.005769.

[3] Palmer ME, Andrews LJ, Abbey TC, Dahlquist AE, Wenzler E. The importance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in antimicrobial drug development and their influence on the success of agents developed to combat resistant gram negative pathogens: A review. Front Pharmacol 2022;13:888079. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.888079.

[4] Katsube T, Yamano Y, Yano Y. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling and Simulation for in Vivo Bactericidal Effect in Murine Infection Model. JPharmSci 2008;97:1606–14. https://doi.org/10.1002/jps.21062.

[5] de Araujo BV, Diniz A, Palma EC, Buffé C, Costa TD. PK-PD modeling of β-lactam antibiotics: In vitro or in vivo models? J Antibiot 2011;64:439–46. https://doi.org/10.1038/ja.2011.29.

[6] Khan DD, Friberg LE, Nielsen EI. A pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) model based on in vitro time-kill data predicts the in vivo PK/PD index of colistin. J Antimicrob Chemother 2016;71:1881–4. https://doi.org/10.1093/jac/dkw057.

[7] Lin Y-W, Zhou QT, Han M-L, Onufrak NJ, Chen K, Wang J, et al. Mechanism-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Aerosolized Colistin in a Mouse Lung Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2018;62:e01965-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01965-17.

[8] Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin M-E, Schuck VJ, Nichols WW, et al. A mathematical model-based analysis of the time–kill kinetics of ceftazidime/avibactam against Pseudomonas aeruginosa. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2018;73:1295–304. https://doi.org/10.1093/jac/dkx537.

[9] Sou T, Hansen J, Liepinsh E, Backlund M, Ercan O, Grinberga S, et al. Model-Informed Drug Development for Antimicrobials: Translational PK and PK/PD Modeling to Predict an Efficacious Human Dose for Apramycin. Clin Pharmacol Ther 2021;109:1063–73. https://doi.org/10.1002/cpt.2104.

[10] Chauzy A, Akrong G, Aranzana-Climent V, Moreau J, Prouvensier L, Mirfendereski H, et al. PKPD Modeling of the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B in vivo. Front Pharmacol 2022;13:842921. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842921.

[11] Aranzana-Climent V, Hughes D, Cao S, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, et al. Translational in vitro and in vivo PKPD modelling for apramycin against Gram-negative lung pathogens to facilitate prediction of human efficacious dose in pneumonia. Clinical Microbiology and Infection 2022;28:1367–74. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.05.003.

[12] Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. Front Microbiol 2018;9:572. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00572.

[13] Thorsted A. Pharmacometrics to characterize innate immune response and antibacterial treatments 2020.

[14] Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. Mucosal Immunol 2017;10:299–306. https://doi.org/10.1038/mi.2016.108.

[15] Eisenreich W, Dandekar T, Heesemann J, Goebel W. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. Nat Rev Microbiol 2010;8:401–12. https://doi.org/10.1038/nrmicro2351.

[16] Son MS, Matthews WJ, Kang Y, Nguyen DT, Hoang TT. In Vivo Evidence of Pseudomonas aeruginosa Nutrient Acquisition and Pathogenesis in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. Infect Immun 2007;75:5313–24. https://doi.org/10.1128/IAI.01807-06.

[17] Veening JG, Barendregt HP. The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid; a review. Cerebrospinal Fluid Res 2010;7:1. https://doi.org/10.1186/1743-8454-7-1.

[18] Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015;13:269–84. https://doi.org/10.1038/nrmicro3432.

[19] Schwameis R, Fille M, Manafi M, Zeitlinger M, Sauermann R. Enhanced activity of linezolid against Staphylococcus aureus in cerebrospinal fluid. Res Microbiol 2012;163:157–60. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.004.

[20] Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, et al. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018;37:1091–8. https://doi.org/10.1007/s10096-018-3221-y.

[21] Friberg LE. Pivotal Role of Translation in Anti-Infective Development. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2021;109:856–66. https://doi.org/10.1002/cpt.2182.

[22] M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute n.d. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/ (accessed March 7, 2023).

[23] EUCAST_SOP_10.2_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20211202.pdf n.d.

[24] Mouton JW. Soup with or without meatballs: Impact of nutritional factors on the MIC, kill-rates and growth-rates. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2018;125:23–7. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.008.

[25] Moore RA, Bates NC, Hancock RE. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob Agents Chemother 1986;29:496–500. https://doi.org/10.1128/AAC.29.3.496.

[26] Jaidane N, Naas T, Mansour W, Radhia BB, Jerbi S, Boujaafar N, et al. Genomic analysis of in vivo acquired resistance to colistin and rifampicin in Acinetobacter baumannii. International Journal of Antimicrobial Agents 2018;51:266–9. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.016.

[27] 90922dat.pdf n.d. https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/312/461/90922dat.pdf

[28] Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001;28:481–504. https://doi.org/10.1023/a:1012299115260.

[29] Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Study of the stability of polymyxins B(1), E(1) and E(2) in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2002;29:203–12. https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00016-x.

[30] Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:733–8.

[31] Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2016;43:583–96. https://doi.org/10.1007/s10928-016-9487-8.

[32] Guo B, Abdelraouf K, Ledesma KR, Chang K-T, Nikolaou M, Tam VH. Quantitative Impact of Neutrophils on Bacterial Clearance in a Murine Pneumonia Model ▿ . Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4601–5. https://doi.org/10.1128/AAC.00508-11.

[33] Eales BM, Bai B, Merlau PR, Tam VH. Growth of *Acinetobacter baumannii* impacted by iron chelation. Letters in Applied Microbiology 2023:ovad019. https://doi.org/10.1093/lambio/ovad019.

[34] Janssen AB, Schaik W van. Harder, better, faster, stronger: Colistin resistance mechanisms in Escherichia coli. PLOS Genetics 2021;17:e1009262. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009262.

[35] Li M. Pan-transcriptomic analysis identified common differentially expressed genes of Acinetobacter baumannii in response to polymyxin treatments 2020.

[36] Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J, Boniatti MM, Dalarosa MG, Falci DR, et al. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. Clin Infect Dis 2013;57:524–31. https://doi.org/10.1093/cid/cit334.

[37] Atchison DK, Beierwaltes WH. The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. Pflugers Arch 2013;465:59–69. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1107-x.

[38] Romani AMP. Intracellular magnesium homeostasis. In: Vink R, Nechifor M, editors. Magnesium in the Central Nervous System, Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011.

8. SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1: *PK/PD model parameter values for A: ATCC 19606, B: AB121-D0 and C: AB122-D12. With and Without cations compensation to CAMHB-100% level. CI: confidence interval; PMB: polymyxin B. The 95% CI was obtained by Sampling Importance Resampling (SIR).*

A

ATCC 19606			
Parameter	**Description (Unit)**	**Estimate (95% CI)**	
		Without	**With**
INOC	Initial inoculum (Log_{10} CFU/mL)	6.00 (5.95 to 6.06)	
BMAX	Maximum bacterial population size (Log_{10} CFU/mL)	8.31 (8.19 to 8.44)	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum	-5.25 (-5.49 to -5.05)	
Knet	Apparent growth rate constant (K_{growth}-K_{death}) (h^{-1})	1.47 (1.37 to 1.57)	
γ	Hill factor on PMB effect	0.618 (0.542 to 0.724)	
$Emax_S$	Maximum rate of PMB effect for susceptible subpopulation (h^{-1})	12.0 (11.57 to 12.58)	
EC_{50S}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax, for susceptible subpopulation (mg/L)	0.098 (0.056 to 0.147)	
$Emax_R$ - CAMHB 100%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 100% (h^{-1})	1.54 (1.35 to 1.74)	
$Emax_R$ - CAMHB 50%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 50% (h^{-1})	1.97 (1.73 to 2.19)	1.71 (1.49 to 1.94)
$Emax_R$ - CAMHB 25%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 25% (h^{-1})	2.46 (2.18 to 2.76)	2.41 (2.12 to 2.68)
$Emax_R$ - CAMHB 10%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 10% (h^{-1})	3.31 (2.94 to 3.74)	3.37 (2.97 to 3.82)
EC_{50R}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax, for resistant subpopulation (mg/L)	2.80 (2.19 to 3.56)	
σ	Additive residual error on log10 scale for total bacteria count (Log_{10} CFU/mL)	0.973 (0.879 to 1.111)	

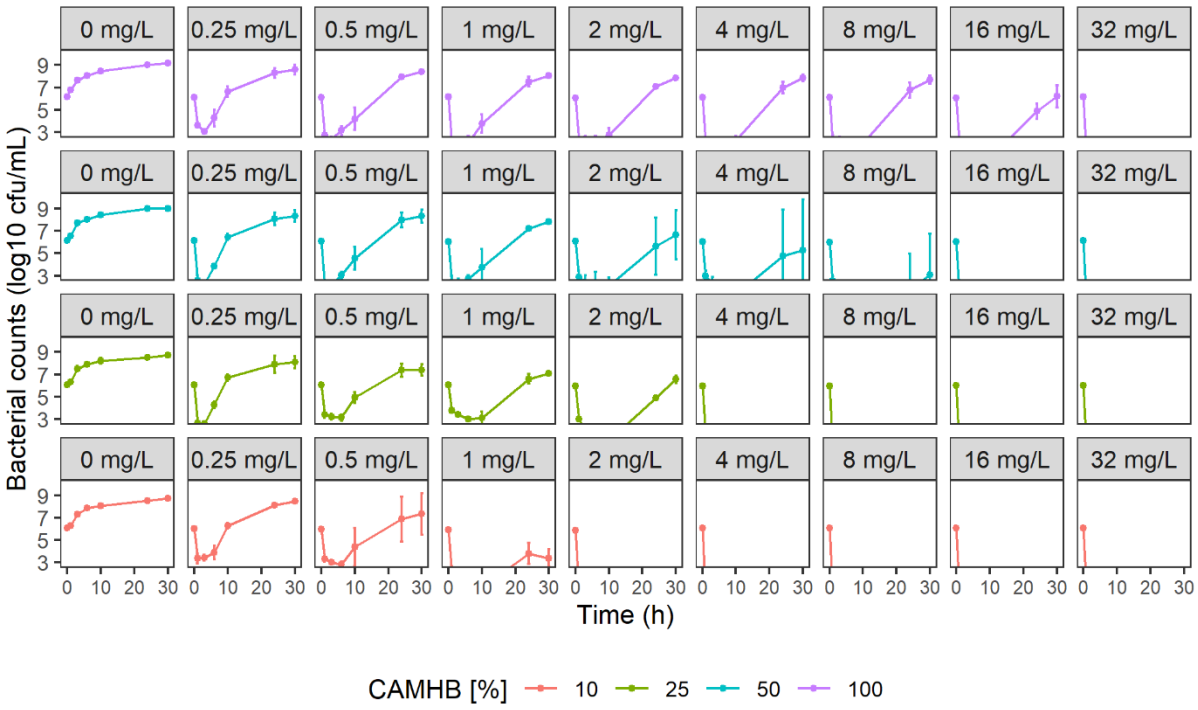
B

AB121-D0			
Parameter	**Description (Unit)**	**Estimate (95% CI)**	
		Without	**With**
INOC	Initial inoculum (Log_{10} CFU/mL)	5.87 (5.82 to 5.91)	
BMAX	Maximum bacterial population size (Log_{10} CFU/mL)	8.26 (8.13 to 8.41)	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum	-4.88 (-5.11 to -4.61)	
Knet	Apparent growth rate constant (K_{growth}-K_{death}) (h^{-1})	2.02 (1.84 to 2.18)	
γ	Hill factor on PMB effect	1.27 (1.06 to 1.51)	
$Emax_S$	Maximum rate of PMB effect for susceptible subpopulation (h^{-1})	12.8 (11.96 to 13.73)	
EC_{50S}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax, for susceptible subpopulation (mg/L)	0.137 (0.084 to 0185)	
$Emax_R$ - CAMHB 100%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 100% (h^{-1})	1.87 (1.68 to 2.04)	
$Emax_R$ - CAMHB 50%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 50% (h^{-1})	2.11 (1.87 to 2.34)	1.73 (1.46 to 1.99)
$Emax_R$ - CAMHB 25%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 25% (h^{-1})	2.71 (2.23 to 3.44)	2.11 (1.85 to 2.38)
$Emax_R$ - CAMHB 10%	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation in CAMHB 10% (h^{-1})	3.04 (2.41 to 3.74)	1.96 (1.68 to 2.37)
EC_{50R} - CAMHB 100%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant subpopulation in CAMHB 100% (mg/L)	0.425 (0.328 to 0.532)	
EC_{50R} - CAMHB 50%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant subpopulation in CAMHB 50% (mg/L)	0.419 (0.312 to 0.532)	0.816 (0.451 to 1.397)
EC_{50R} - CAMHB 25%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant subpopulation in CAMHB 25% (mg/L)	1.5 (1.05 to 2.31)	1.21 (0.87 to 1.70)
EC_{50R} - CAMHB 10%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant subpopulation in CAMHB 10% (mg/L)	1.6 (1.04 to 2.44)	2.14 (1.33 to 3.60)
σ	Additive residual error on log10 scale for total bacteria count (Log_{10} CFU/mL)	1.55 (1.42 to 1.71)	

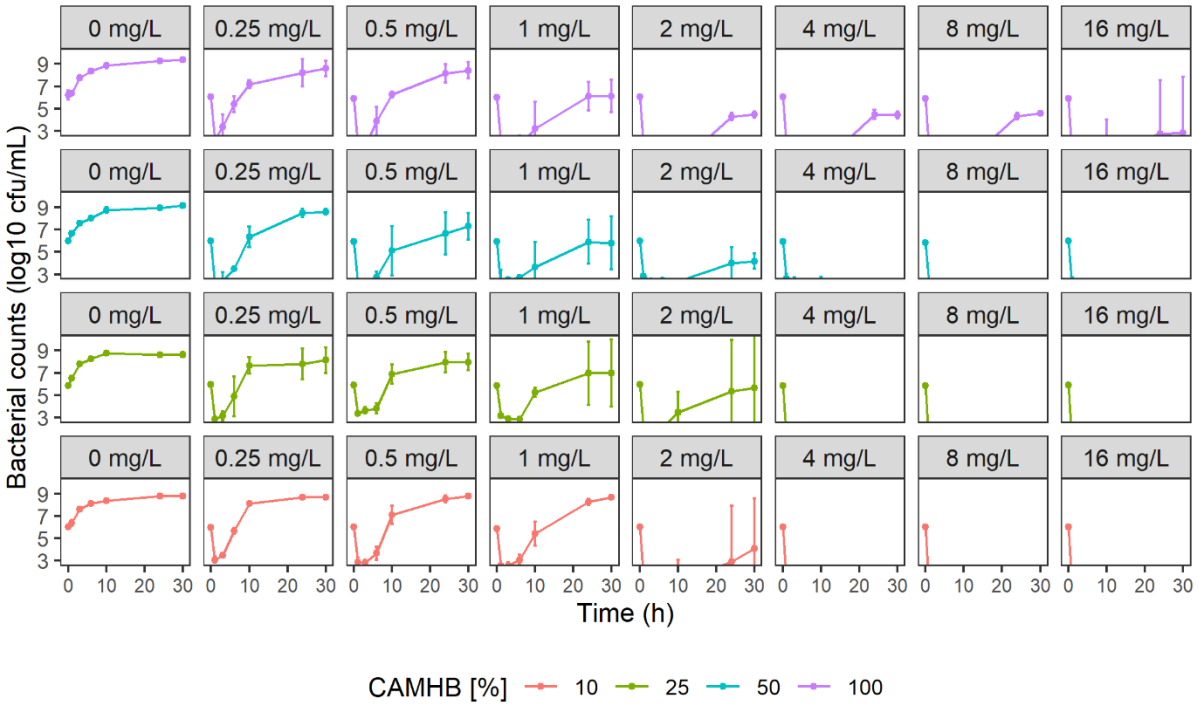
C

AB122-D12			
Parameter	**Description (Unit)**	**Estimate (95% CI)**	
		Without	**With**
INOC	Initial inoculum (Log_{10} CFU/mL)	5.66 (5.56 to 5.75)	
BMAX	Maximum bacterial population size (Log_{10} CFU/mL)	8.38 (8.30 to 8.47)	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum	-4.43 (-4.68 to -4.17)	
Knet	Apparent growth rate constant (K_{growth}-K_{death}) (h^{-1})	2.69 (2.49 to 2.90)	
γ	Hill factor on PMB effect	1.43 (1.29 to 1.58)	
$Emax_S$	Maximum rate of PMB effect for susceptible subpopulation (h^{-1})	21.9 (19.16 to 25.76)	
$Emax_R$	Maximum rate of PMB effect for resistant subpopulation (h^{-1})	2.99 (2.76 to 3.24)	
EC_{50} - CAMHB 100%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax in CAMHB 100% (mg/L)	60.4 (53.8 to 68.6)	
EC_{50} - CAMHB 50%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax in CAMHB 50% (mg/L)	13.4 (11.7 to 15.4)	32.8 (28.9 to 38.0)
EC_{50} - CAMHB 25%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax in CAMHB 25% (mg/L)	3.73 (3.28 to 4.29)	19.3 (16.3 to 23.2)
EC_{50} - CAMHB 10%	PMB concentration needed to reach 50% of Emax in CAMHB 10% (mg/L)	1.13 (0.98 to 1.34)	7.20 (6.07 to 8.55)
σ	Additive residual error on log10 scale for total bacteria count (Log_{10} CFU/mL)	0.685 (0.621 to 0.761)	

A


0 mg/L
0.25 mg/L
0.5 mg/L
1 mg/L
2 mg/L
4 mg/L
8 mg/L
16 mg/L
32 mg/L
Bacterial counts (log10 cfu/mL)
Time (h)
CAMHB [%] 10 25 50 100

B


0 mg/L
0.25 mg/L
0.5 mg/L
1 mg/L
2 mg/L
4 mg/L
8 mg/L
16 mg/L
Bacterial counts (log10 cfu/mL)
Time (h)
CAMHB [%] 10 25 50 100

C

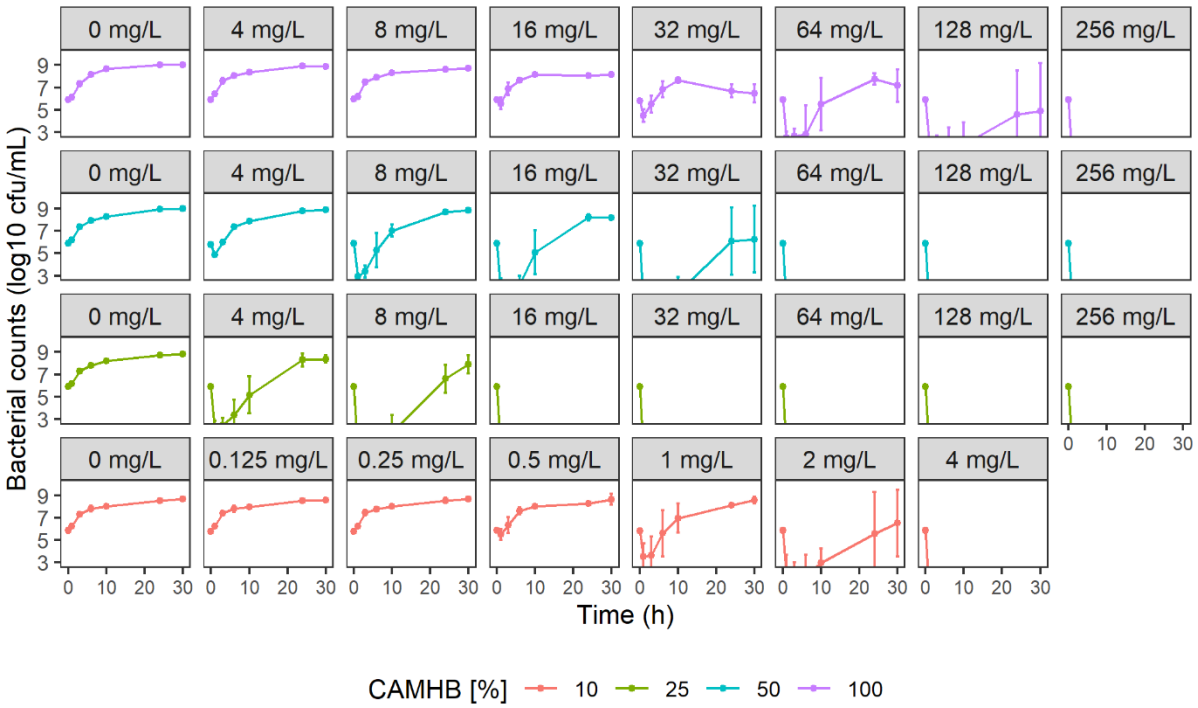
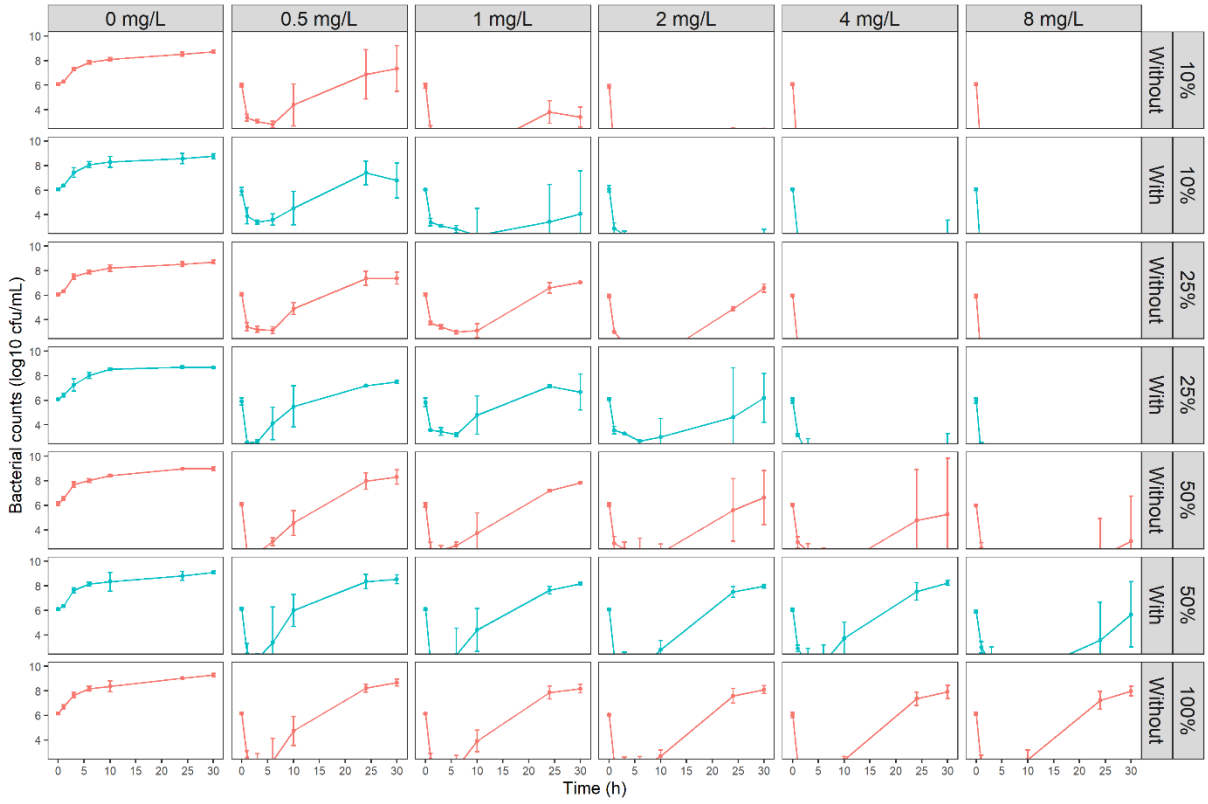
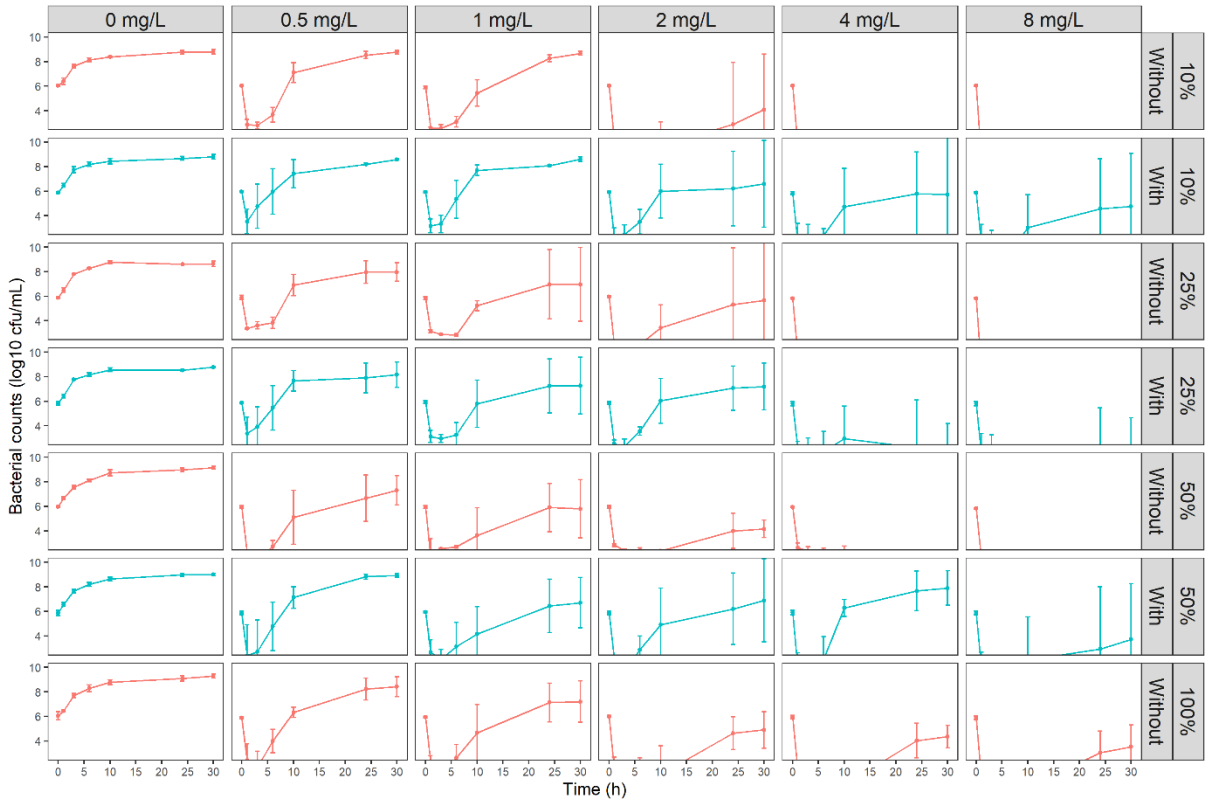


Figure S1: *Time-kill of A: ATCC 19606, B: AB121-D0 and C: AB122-D12 for CAMHB dilutions of 100%, 50%, 25% and 10% (without cations compensention). Lines correspond to the mean and error bars to the standard deviation of triplicates.*

A


0 mg/L
0.5 mg/L
1 mg/L
2 mg/L
4 mg/L
8 mg/L
Without 10%
With 10%
Without 25%
With 25%
Without 50%
With 50%
Without 100%
Bacterial counts (log10 cfu/mL)
Time (h)

B


0 mg/L
0.5 mg/L
1 mg/L
2 mg/L
4 mg/L
8 mg/L
Without 10%
With 10%
Without 25%
With 25%
Without 50%
With 50%
Without 100%
Bacterial counts (log10 cfu/mL)
Time (h)

C

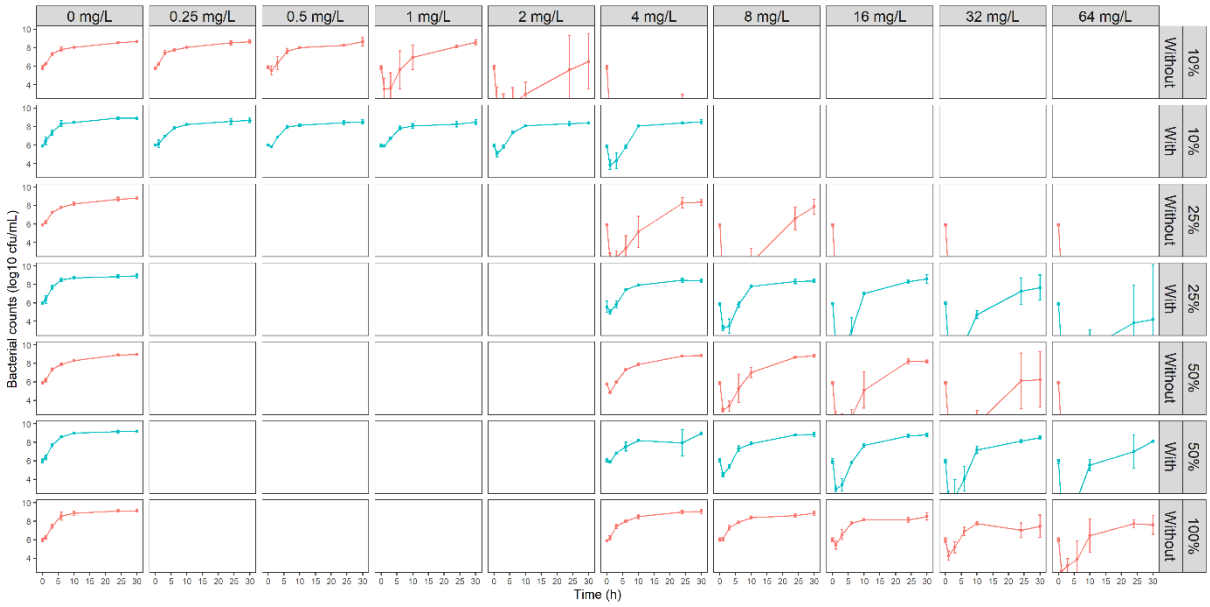
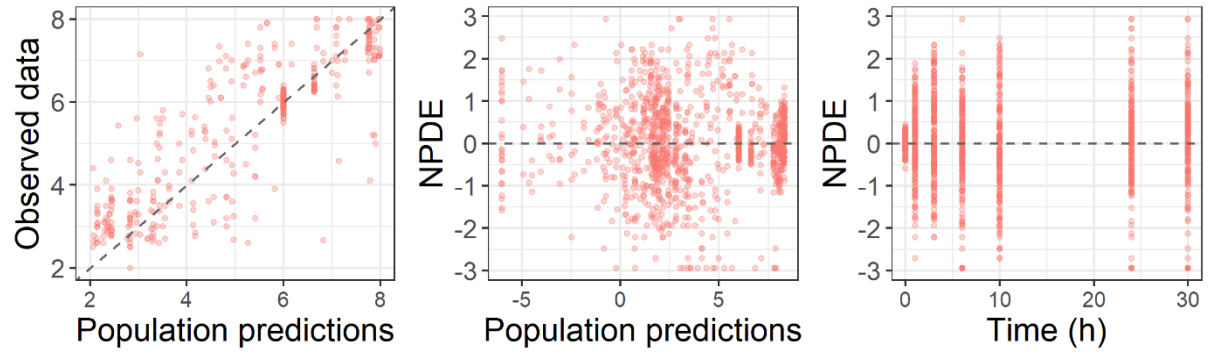
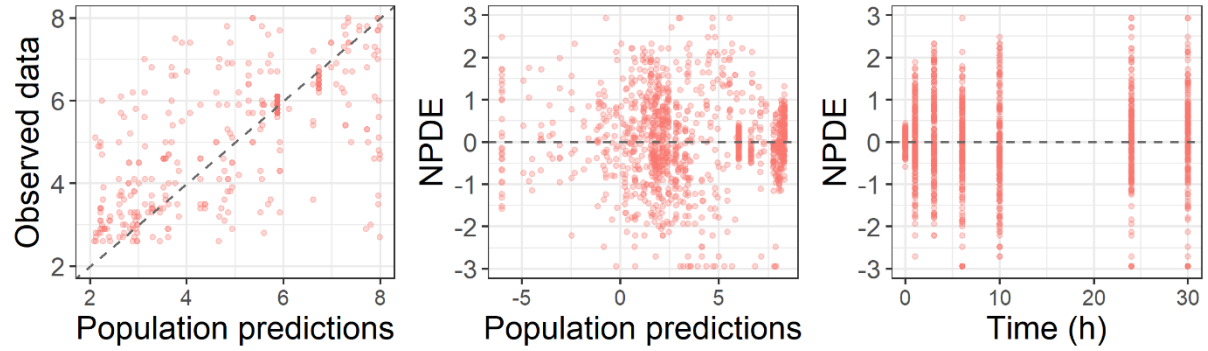


Figure S2: *Time-kill of A: ATCC 19606, B: AB121-D0 and C: AB122-D12 with or without cations compensation for CAMHB dilution (100%, 50%, 25% and 10%). Lines correspond to the mean and error bars to the standard deviation of triplicates.*

A



B



C

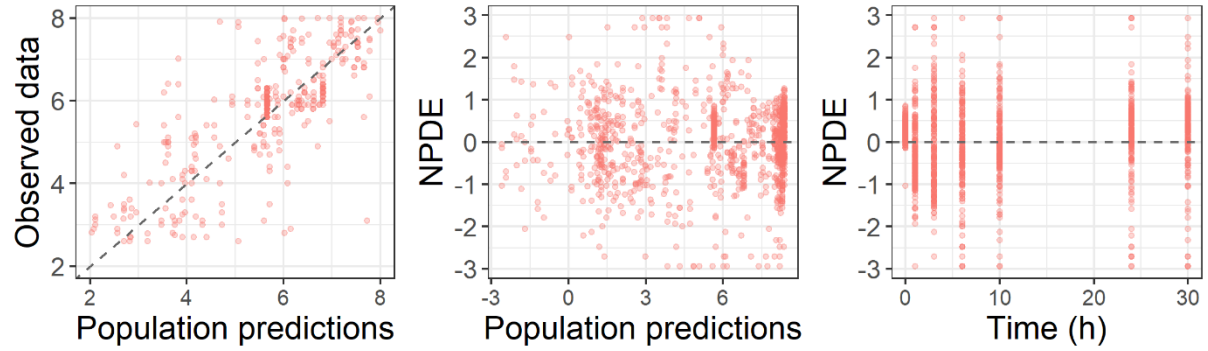
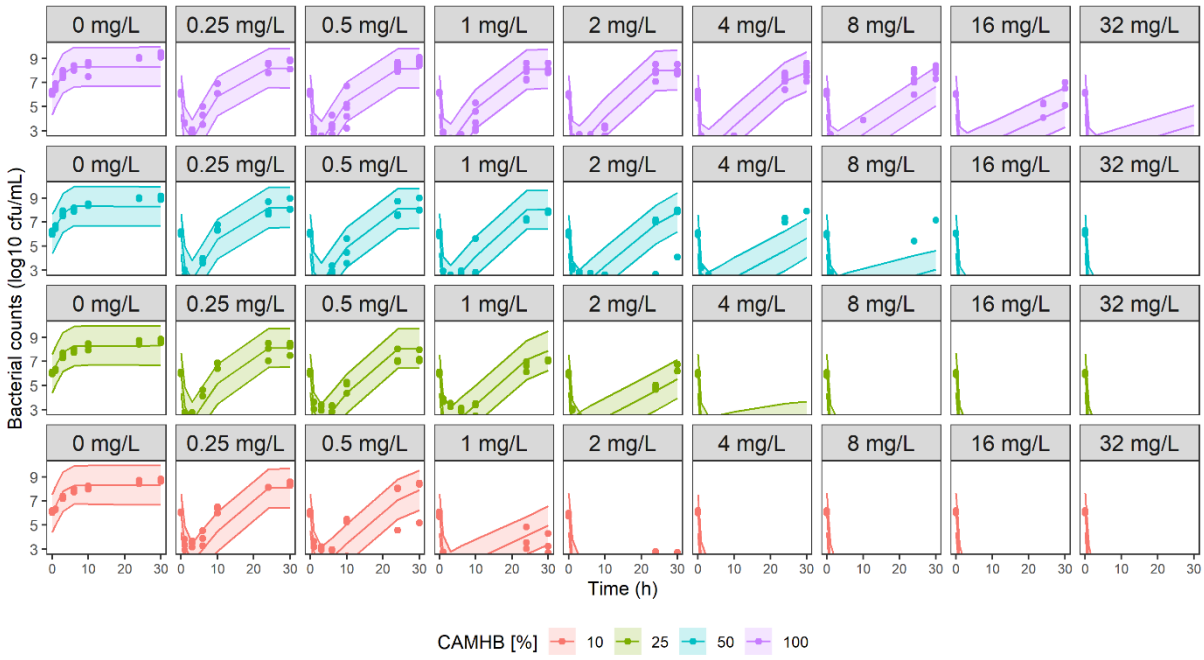


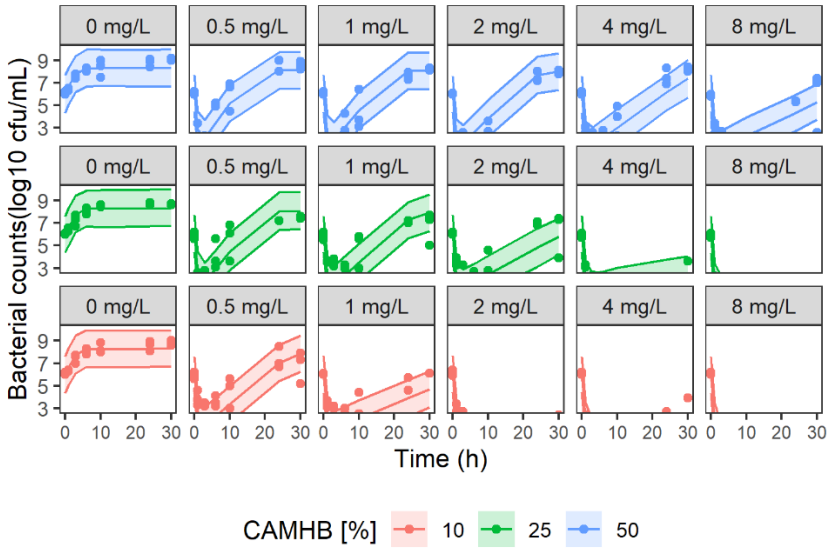
Figure S3: *Goodness of Fit plots (GOF) for A: ATCC 19606, B: AB121-D0 and C: AB122-D12. NPDE, Normalized prediction distribution errors.*

A

ATCC 19606 – With diluted medium

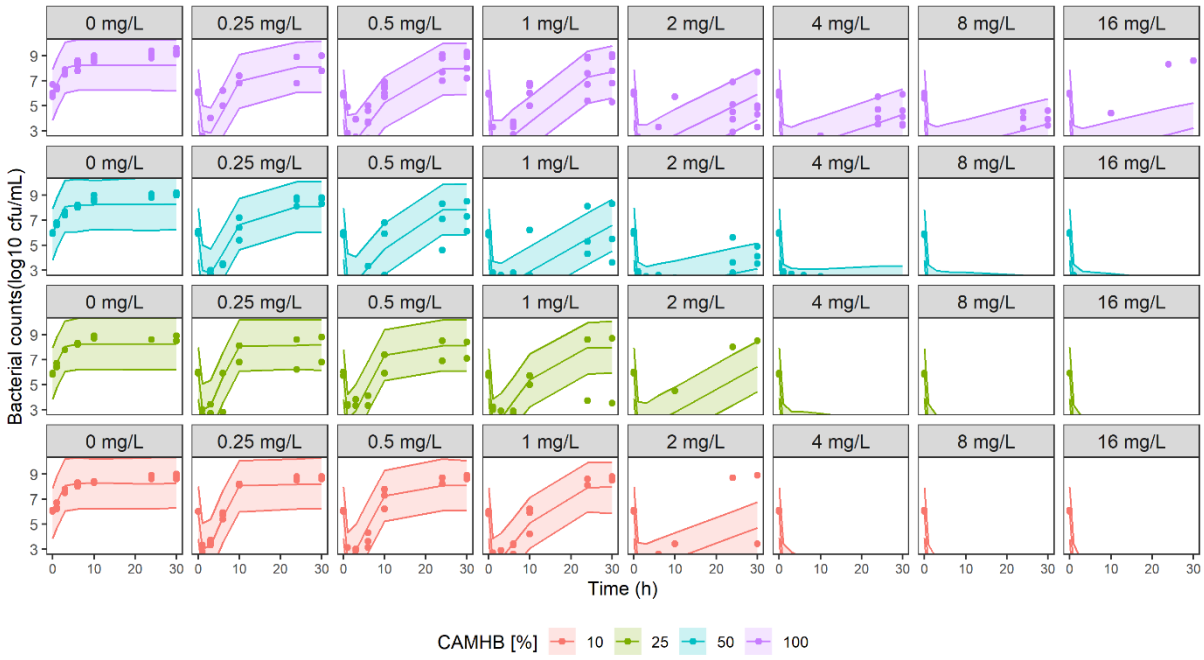


ATCC 19606 – With diluted medium and cations compensation

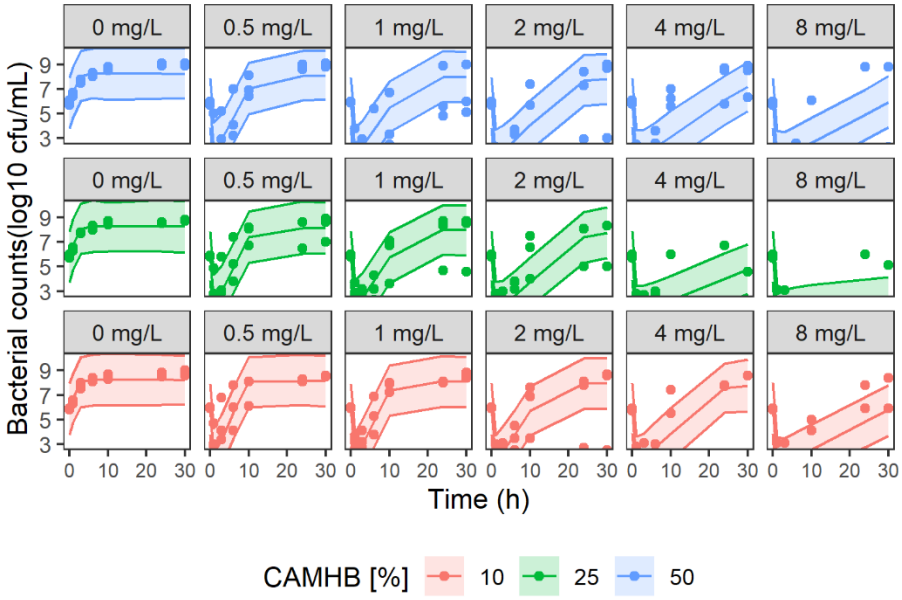


B

AB121-D0 – With diluted medium

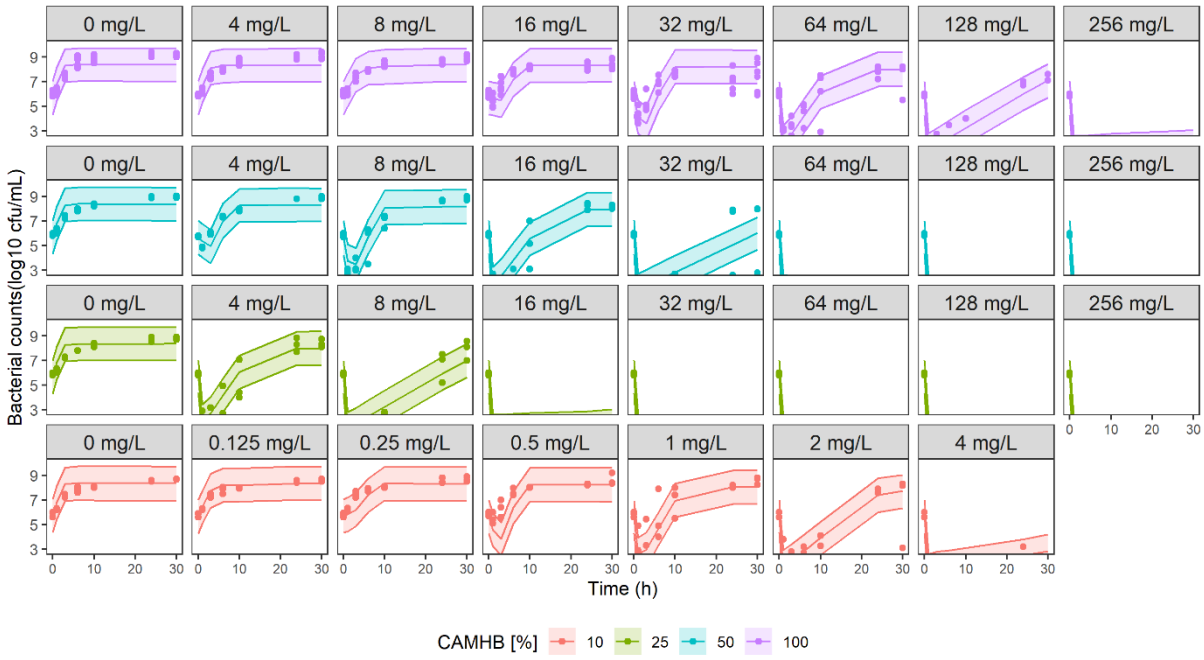


AB121-D0 – With diluted medium and cations compensation



C

AB122-D12 – With diluted medium



AB122-D12 – With diluted medium and cations compensation

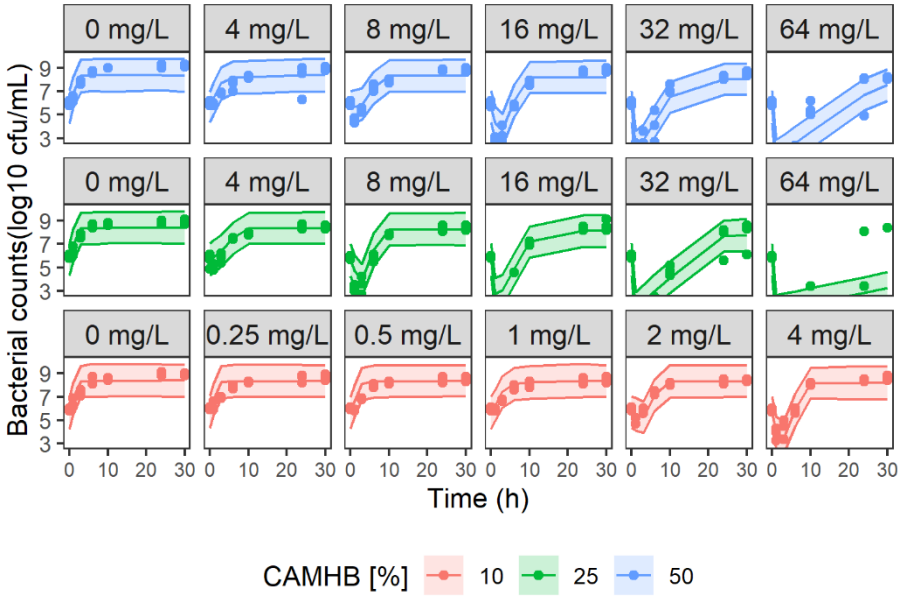


Figure S4: *Visual predictive check of A: ATCC 19606, B: AB121-D0 and C: AB122-D12. Circles represent experimental data, solid lines depict the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1,000 simulated profiles*

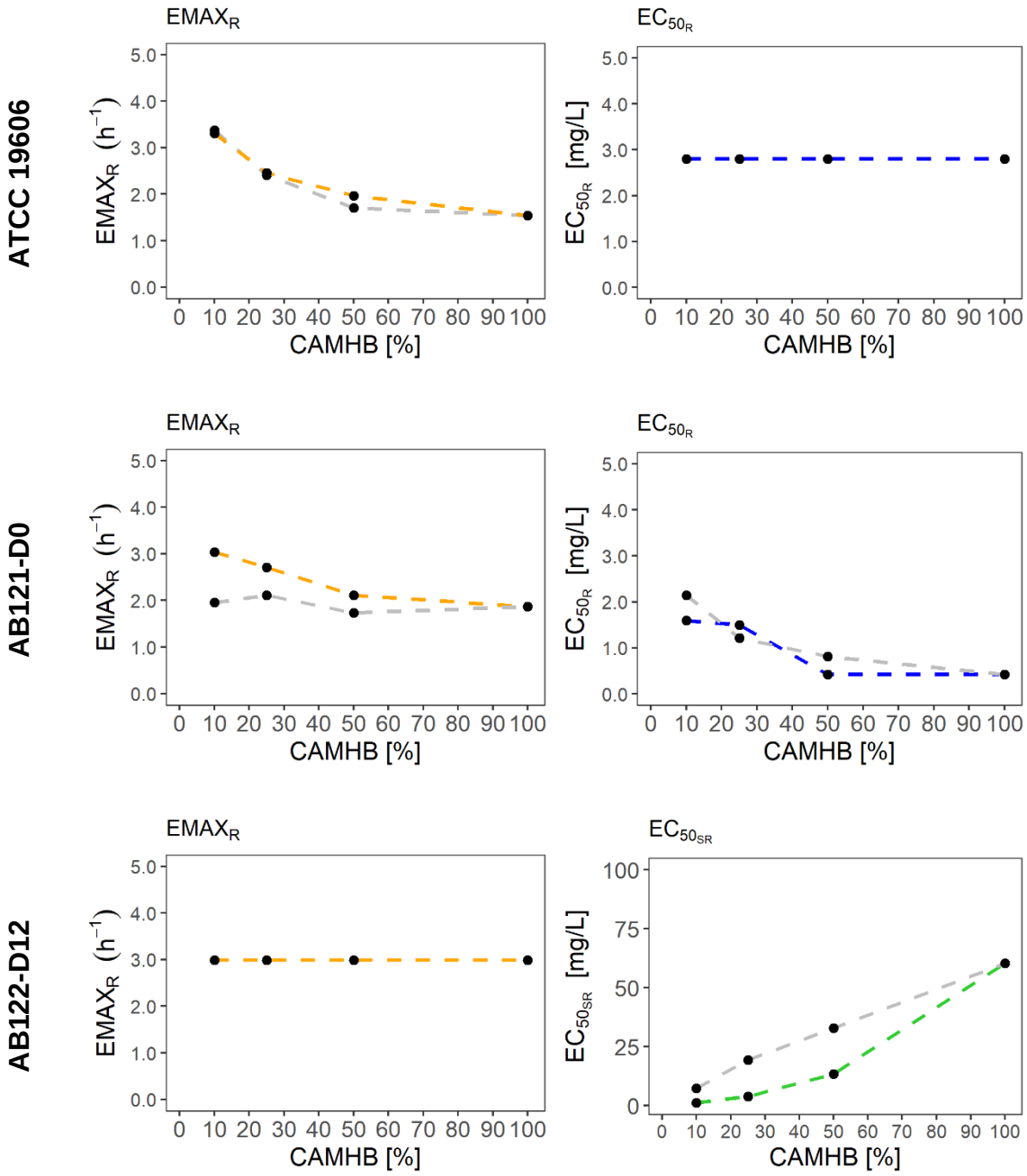


Figure S5: *Graphical representation of the impact of CAMHB dilutions on the model parameters describing PMB antibacterial effect on the R sub-population of the three A. baumannii strains. Grey lines depicted parameter values with cations compensation. Dots have been connected for identification purpose.*

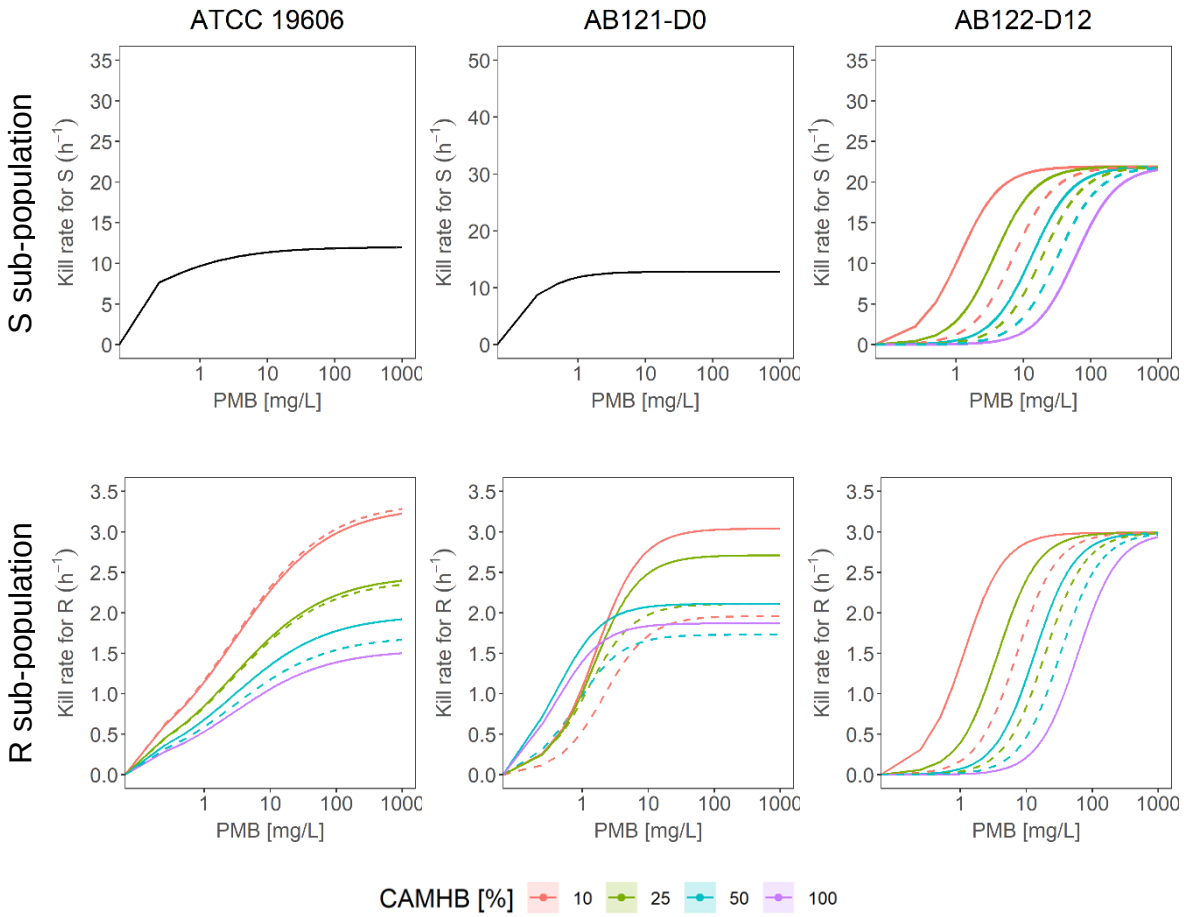


Figure S6: *Simulation of PMB kill rate versus PMB concentrations for various CAMHB dilutions. Black curves corresponded to kill rate not influenced by CAMHB dilutions. Dashed lines depicted data with cations compensation to CAMHB-100% level.*

Article n°3: *In vitro* PK/PD modelling of mucin effect on polymyxin B against *Acinetobacter baumannii*

Article en préparation: *Mathilde Lacroix, Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hélène Mirfendereski, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy*

Résumé en français :

Les infections pulmonaires à Acinetobacter baumannii sont souvent difficiles à traiter en raison de souches multi-résistantes aux médicaments. En outre, il a été démontré que la présence de mucine (principal composant du mucus) dans les poumons diminuait l'activité des polymyxines. L'objectif de cette étude était de caractériser l'effet de la mucine sur l'activité de la polymyxine B (PMB) contre *A. baumannii in vitro*, en utilisant une approche de modélisation PK/PD.

La liaison du PMB à la mucine a été caractérisée dans du bouillon Mueller-Hinton ajusté en cations (CAMHB) complété par 1% de mucine, par ultracentrifugation. Les concentrations de PMB non liées ont été mesurées par LC-MS/MS pour la détermination de la fraction non liée de PMB (f_{u_m}) en présence de mucine. Des expériences de CMI et de Time-kill (TK) ont été réalisées en CAMHB, avec 1% de mucine ou sans comme contrôle, avec deux souches cliniques d'*A. baumannii* sensibles (AB121-D0) ou résistantes (AB122-D12) à la PMB. La numération bactérienne a été déterminée (3 réplicats) à différents temps, et combinée dans un modèle PK/PD utilisant NONMEM®, avec deux sous-populations bactériennes (S/R) pour tenir compte de la repousse. Les concentrations totales de PMB en présence de mucine ont été corrigées par f_{u_m} pour les expériences MIC et TK. La caractérisation de la résistance stable de la PMB a été effectuée via la détermination de la CMI et séquençage du génome.

Le f_{u_m} a augmenté de 6 % à 60 % lorsque la concentration totale est passée de 0.5 à 512 mg/L, et une relation Emax sigmoïdal a été trouvé entre le f_{u_m} et la CT. La CMI des concentrations non liées de PMB a montré, respectivement pour AB121-D0 et AB122-D12, une augmentation d'un facteur 13 et 20 en présence de mucine. Le modèle PK/PD sélectionné a permis une bonne description des données TK. Pour AB121-D0, l'Emax pour la sous-population R a été multiplié par 1.4 en présence de mucine. Pour AB122-D12, le K_{net} a été divisé par ~2 et l'EC_{50} pour les sous-populations S et R, a été multiplié par ~5. La réduction de l'activité de la PMB en présence de mucine observée dans la CMI n'a été confirmée que pour AB122-D12. La repousse bactérienne observée après une diminution initiale des UFC dans les expériences TK était associée à une augmentation de la CMI d'un facteur ≥ 4 pour 42% et 16% des échantillons bactériens prélevés à T30h pour AB121-D0 et AB122-D12, respectivement. Des mutations

ont été détectées dans l'opéron *pmrABC* pour 82% des échantillons AB121-D0 et dans *lpxACD* pour 57% des échantillons d'AB122-D12, pour lesquels la CMI de la PMB a été augmentée à la fin des expériences de Time-kill.

Cette étude de modélisation PK/PD *in vitro* a démontré que la liaison de la PMB à la mucine n'est pas le seul déterminant des changements d'effet observés de la PMB en présence de mucine.

In vitro PK/PD modelling of mucin effect on polymyxin B against *Acinetobacter baumannii*

Mathilde Lacroix [1, 2], Jérémy Moreau [1], Claudia Zampaloni [3a], Caterina Bissantz [3b], Hélène Mirfendereski [4], Hamasseh Shirvani [2], Sandrine Marchand [1, 4], William Couet [1, 4], Alexia Chauzy [1#]

[1] Université de Poitiers, INSERM U1070, PHAR2 - Poitiers (France)
[2] Institut Roche - Boulogne-Billancourt (France)
[3] Roche Pharma Research and Early Development, [a] Immunology, Infectious Disease and Ophthalmology, [b] Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
[4] CHU Poitiers, Département de Pharmacocinétique et Toxicologie - Poitiers (France)

[#] **Corresponding author**:

Alexia CHAUZY

alexia.chauzy@univ-poitiers.fr

INSERM U1070 - Université de Poitiers

Pôle Biologie Santé - Bâtiment B36

1 rue Georges Bonnet

86022 POITIERS Cedex, France

1. ABSTRACT

Pulmonary infections with *Acinetobacter baumannii* are often difficult to treat due to multidrug resistance. Furthermore, the presence of mucin (main component of mucus) in lung has been shown to decrease polymyxin activity. The aim of this study was to characterize the effect of mucin on polymyxin B (PMB) activity against *A.baumannii in vitro*, using a PK/PD modelling approach.

PMB binding on mucin was characterized in cation adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) supplemented by 1% mucin, by ultracentrifugation. Unbound PMB concentrations were measured by LC-MS/MS for PMB unbound fraction ($f u_m$) determination in presence of mucin. MIC and Time-kill (TK) experiments were performed in CAMHB, with 1% mucin or without as control, with two clinical *A. baumannii* strains susceptible (AB121-D0) or resistant (AB122-D12) to PMB. PMB total concentrations (CT) varied between 0.5 and 512 mg/L according to strain's MIC (1 mg/L for AB121-D0 and 64 mg/L for AB122-D12). Bacterial count was determined (3 replicates) at various, and combined in a PK/PD model using NONMEM®, with two bacterial sub-populations (S/R) to account for regrowth. PMB total concentrations in presence of mucin were corrected by $f u_m$ for both MIC and TK experiments. PMB stable resistance characterization was done via MIC and whole-genome sequencing at T30h from TK tubes where regrowth was observed in presence of antibiotic.

$f u_m$ increased from 6% to 60% when total concentration increased from 0.5 to 512 mg/L, and a sigmoidal Emax model was found between $f u_m$ and CT. MIC of PMB unbound concentrations showed respectively for AB121-D0 and AB122-D12, 13 and 20-fold increase in presence of mucin. The selected PK/PD model provided good TK data fitting. For AB121-D0, Emax for R subpopulation increased by 1.4-fold in presence of mucin. For AB122-D12, K_{net} was divided by ~2-fold and EC_{50} for both S and R subpopulations was ~5-fold increased. Reduced PMB activity with mucin observed in MIC was confirmed only for AB122-D12. Bacterial regrowth observed after an initial CFU decay in TK experiments was associated with an increase of the MIC by a factor ≥ 4 for 42% and 16% of samples collected at T30h for AB121-D0 and AB122-D12, respectively. Mutations were detected in *pmrABC* operon for 82% of AB121-D0 samples and in *lpxACD* for 57% of AB122-D12 samples, for which the PMB MIC was increased at the end of the TK experiments.

This *in vitro* PK/PD modelling study demonstrated that PMB binding is not the sole determinant of changes in PMB effect in the presence of mucin.

2. INTRODUCTION

Acinetobacter baumannii is a common and critical pathogen for patients with hospital-acquired pneumonias that is related to high morbidity and mortality [1]. Treating these infections can be extremely difficult due to the high prevalence of multidrug resistant (MDR) *A. baumannii* strains [2]. First left behind due to their nephrotoxic properties [3], polymyxins (colistin and polymyxin B (PMB)) are now used as last-resort antibiotics, as they show high *in vitro* activity against MDR *A. baumannii*. However, to reach the bacteria in lung infections, antibiotics need to diffuse through the mucus layer where they may bind to mucus particles, impairing their availability at the site of infection [4]. Mucus is composed of 90%-95% of water and 1-2% of lipids but its main functional component is mucin which correspond to 1-5% [5] of its composition in physiological condition. It can however increase in case of chronic lung diseases such as cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or cancer [6–8]. Mucin molecules are composed mainly of carbohydrates and proteins, assembled together to form a multimeric network, responsible of the viscoelasticity properties of mucus. Gel-forming mucin has a role of protection and lubrication [9] but it can also delay the antibiotic diffusion through the mucus layer and bind to certain antibiotics such as polymyxins, aminoglycosides and fluoroquinolones due to its polymeric composition and overall negative charge [10–13]. In the airways, mucin binding may lead to insufficient antibiotic levels at the site of infection, reducing their antibacterial efficacy, as only free drug can be active against bacteria. In particular, colistin (85%) and PMB (84%) showed a strong binding to mucin, explaining in part the >100-fold increase in MICs in the presence of mucin compared to MICs in the absence of mucin for multiple Gram-negative bacteria including *A. baumannii* [14]. However, this previous study evaluating PMB binding to mucin by the dialysis method has some limitations, including an insufficient incubation time (4h) to reach equilibrium and the lack of assessment of non-specific binding to the dialysis equipment, which may have led to inaccurate determination of the PMB unbound fraction. Moreover, to the best of our knowledge, the efficacy of PMB in the presence of mucin was only assessed at a single time point, by determining the MIC after 24 h of incubation [14] or the number of surviving bacteria after 2h of exposure to the antibiotic [13], which did not allow to properly characterize the impact of mucin on the time-course of the antibacterial effect.

Therefore, the aims of this study were to properly characterize PMB binding to mucin by ultracentrifugation and to assess the impact of mucin on PMB activity against *A. baumannii in vitro*, using a pharmacokinetic/pharmacodynamics (PK/PD) modelling approach.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Chemicals and strains

Polymyxin B (PMB) was obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France), and used to prepare stock solutions in sterile water.

A 20% solution of mucin from porcine stomach (Mucin type III, Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France), was prepared in NaCl 0.9% with a pH adjusted to 7, then autoclaved at 110°C during 15 minutes. The solution was diluted for time-kill experiments to obtain a final concentration of 1% in cation adjusted Mueller-Hinton broth II (CAMHB) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Two clinical multi-drug resistant (MDR) strains of *Acinetobacter baumannii*, isolated from a patient before (AB121-D0) and 12 days after treatment with colistin (AB122-D12), were used during this study [15].

3.2. MIC determination

PMB minimum inhibitory concentrations (MICs) of both *A. baumannii* strains were determined in commercial CAMHB (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations [16,17]. PMB MICs of the two *A. baumannii* isolates were also determined at least in duplicates in CAMHB supplemented with 1% of mucin.

3.3. PMB binding to mucin

PMB solutions at concentrations ranging from 0.5 to 10 000 mg/L in CAMHB with 1% mucin were incubated 1h at 35°C, then ultracentrifuged at ~290 000g during 5h at room temperature

(Beckman Optima LE-80K, rotor: Beckman Coulter 70.1 Ti) (Method adapted from [18]). Unbound PMB concentrations in the supernates were determined by LC-MS/MS (method adapted from a previous publication [19] and detailed in Supplemental material), and used to determine the unbound fraction (fu_m) of PMB. Potential PMB sedimentation [20] during experimentation was determined from PMB solutions prepared in mucin-free CAMHB and subjected to the same ultracentrifugation conditions as previously described, and then used to correct for unbound PMB concentrations.

The same procedure was performed with a non-autoclaved mucin solution. Experiments were done in triplicate.

The relationship between fu_m and PMB total concentrations was modelled according to a sigmoidal Emax function (Equation 1):

$$fu_m = E0 + \frac{Imax \times C^{\varepsilon}}{IC_{50}{}^{\varepsilon} + C^{\varepsilon}} \quad \text{(Eq. 1)}$$

Where E0 represents the minimum fu_m, Imax the maximum increase in fu_m, IC_{50} (mg/L) corresponds to PMB total concentration needed to reach 50% of Imax, C (mg/L) to the PMB total concentration and ε to the Hill coefficient.

Parameters estimation was performed using nonlinear regression with iteratively reweighted least squares (R, version 4.1.3 – Package: robustbase, version 0.99-0). Two sets of parameters were estimated, one for the data generated with autoclaved mucin, another for the data generated without autoclave. The two sets of parameters were compared using ANOVA testing.

3.4. Time-kill experiments (TK)

Bacteria were cultured overnight under shaking (150-170 rpm) in CAMHB at 35°C. Bacterial suspension was then diluted to 1/50, and incubated at 35°C under shaking until an optical density (OD) of 0.3 (corresponding to 1.10^8 CFU/mL of bacteria in exponential growth phase) was achieved. This bacterial suspension was then diluted in order to obtain a starting inoculum at 1.10^6 CFU/mL. TK experiments were performed in CAMHB in absence and in presence of 1% mucin. PMB concentrations varied from 0.5mg/L to 128mg/L for AB121-D0 and 8 mg/L to 512 mg/L for AB122-D12. Drug-free CAMHB was used as bacterial growth control for each

strain. Tubes were incubated at 35°C under shaking (150-170 rpm) and aliquots were sampled over time at T0h, T1h, T3h, T6h, T10h, T24h and T30h. Samples were serially diluted in NaCl 0.9%, and plated onto Mueller-Hinton agar supplemented with 1% activated charcoal (to prevent PMB carry-over effect). Bacteria were counted after overnight incubation at 35°C. The limit of quantification was fixed to 400 CFU/mL (*i.e.* 2.6 $\log_{10}$ CFU/mL). Experiments were conducted in triplicate for both strains. Samples of 1mL for determining stable resistance via MIC and whole-genome sequencing were collected at T30h from tubes where regrowth was observed in presence of antibiotic. Samples were centrifuged (8 minutes at 8 000 rpm), then the supernates were removed and the pellets were stored at -80°C in CAMHB-glycerol 20%. Prior to MIC testing, the isolates were streaked onto drug-free Mueller-Hinton agar plate and incubated for 24h. MICs were determined according to EUCAST and CLSI methods. Sequencing methods are described in detail in the supplemental materials.

3.5. Pharmacodynamic modelling

Bacterial counts obtained from TK experiments without mucin were first modelled using NONMEM 7.4 (ICON plc, Dublin, Ireland) with the Laplacian algorithm and the M3 method for handling observations below the limit of quantification [21]. PMB was assumed to be stable over the course of the experiment as previously shown [22]. A previously described model with hetero-resistance [23], i.e. two bacterial subpopulations, one susceptible to PMB (S) and one resistant (R), was used to describe the time course of bacterial counts for the two *A. baumannii* strains (Figure 1). Different functions were tested to characterize the PMB killing effect (see Supplemental material for model building).

Then, TK data in presence of mucin were included in the dataset and PMB total concentrations were corrected for mucin binding using Equation 1, with unbound PMB concentrations driving the antibacterial effect. The uncertainty associated with each parameter of Equation 1 was taking into account, such as:

$$fu_{m_i} = E0_i + \frac{Imax_i \times C^{\varepsilon_i}}{IC_{50,i}{}^{\varepsilon_i} + C^{\varepsilon_i}} \quad \text{(Eq. 2)}$$

Where the index i represents the i^{th} experiment, each parameter value being specific to a given experiment. Random variability between experiments was included via an additive function for each parameter of Equation 2. For example, $E0_i$ was defined as follows:

$$E0_i = E0_{pop} + \eta_i \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where $E0_{pop}$ is the population parameter and η_i is the deviation from the population value for the i^{th} experiment. The individual η_i values were assumed to be normally distributed with a mean of 0 and the variance ω^2_{E0} fixed to the value obtained for each parameter estimate of Equation 1 (Table 1).

An impact of mucin on PD model parameters was tested on top of PMB binding to mucin with the following equation:

$$P_j = \theta_{j,1} \times (1 - Mucin) + \theta_{j,2} \times Mucin \quad \text{(Eq. 4)}$$

Where P_j was the j^{th} parameter of the PD model, *Mucin* was a categorical variable either equal to 0 or 1 depending on its absence or presence in TK experiments respectively, $\theta_{j,1}$ and $\theta_{j,2}$ corresponded to the P_j value in the absence and in the presence of mucin, respectively.

Model selection was based on objective function value (OFV), relative standard errors (RSEs) of the parameter estimates obtained using the sampling importance resampling (SIR) procedure implemented in PsN [24] and goodness of fit (GOF) plots [25]. Visual predictive checks (VPCs) with stratification on PMB concentration and mucin presence 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 1,000 replicates of the original data set. The concordance between simulations and observations was inspected visually.

4. RESULTS

4.1. PMB binding to mucin

PMB unbound fraction determined in CAMHB with 1% mucin remained relatively stable at 6% for PMB concentrations up to 20mg/L, then increased nonlinearly up to 60% at a PMB concentration of 200mg/L. (Figure 1). Parameters of Equation 1, estimated either from data generated with autoclaved mucin or from data generated without autoclave, were not significantly different from those estimated from all pooled data (P-value = 0.26 - 4 DDL), resulting in very similar fu_m values regardless of how the mucin solution was prepared (Tables S1 and S2). Consequently, the final parameters describing the relationship between fu_m and total PMB concentration were estimated using all data pooled into a single dataset (Table 1).

4.2. Mucin effect on MIC

For AB121-D0, PMB MIC was 64-fold increased in presence of 1% mucin (64 mg/L) compared to the MIC in CAMHB (1 mg/L) (Table 2). For AB122-D12, the MIC was 32 mg/L in CAMHB and 1024 mg/L in CAMHB with 1% mucin, showing a 32-fold increase (Table 2). MIC values obtained in the presence of mucin were corrected by multiplying them by fu_m in order to express them as unbound concentrations, *i.e.* unbound MICs (MIC_u), whereas MICs in the absence of mucin corresponded directly to MIC_u values. The MIC_u ratio in presence and absence of mucin was then equal to 13 for AB121-D0 and 20 for AB122-D12.

4.3. TK experiment and PK/PD modelling

Regrowth was observed after an initial CFU decay for PMB concentrations up to 8 mg/L for AB121-D0 and 128 mg/L for AB122-D12 in CAMHB (Figure S1). In presence of mucin, regrowth was observed for AB121-D0 for unbound PMB concentrations ≤ 0.5 mg/L for 2/3 replicates and ≤ 13 mg/L for 1/3 replicate. For AB122-D12, no PMB concentration in the range tested (up to 304 mg/L) was able to prevent bacterial regrowth in the presence of mucin.

The PMB effect on bacterial killing (Kill rate) was characterized for AB121-D0 by a linear function for the S sub-population and by an Emax model for the R sub-population (Figure S2).

PMB activity for both S and R subpopulations of AB122-D12 were modelled by a sigmoidal Emax model, but with a higher maximum killing rate constant for the S than for the R sub-population (Table 3 and Equations S1 to S4). After correction of total concentrations by f_{u_m}, CFU versus time profiles of the two strains in the presence of mucin were shown to be different from those observed in the absence of mucin for the same unbound PMB concentrations (Figure S3, black boxes). For AB121-D0, regrowth was predicted by the model at unbound PMB concentrations of 1.2 and 3.3 mg/L but not observed in the data. In contrary, for AB122-D12, the regrowth observed at unbound PMB concentrations of 135 and 304 mg/L in presence of mucin was not captured by the model (Figure S3, black boxes).

In order to improve the fit, an additional mucin effect was required and it was added as categorical covariate on the maximal PMB effect parameter for R subpopulation ($Emax_R$) for AB121-D0 (ΔOFV = 146) and on K_{net} and EC_{50} for AB122-D12 (ΔOFV = 307). For AB121-D0, $Emax_R$ increased by 1.4-fold in presence of mucin. For AB122-D12, K_{net} was divided by ~2 and EC_{50} was ~5-fold increased (Table 3). The final PK/PD models described well the TK data, as shown on GOF plots available in supplemental materials (Figure S4) and on visual predictive checks (VPC) on Figure 2.

4.4. Characterization of PMB resistance

A minimum bacterial density of ~10^5 CFU/mL in samples collected at the end of TK experiments was required for MIC susceptibility testing and sequencing.

For AB121-D0, MIC determinations for 6 out of 10 (60%) bacterial samples collected at T30h from TK experiments performed in CAMHB showed increased values (≥32-fold) compared with control MICs determined at T30h of TK experiments in absence of antibiotic (Table 4A). In the presence of mucin, an increase of MICs of the same order of magnitude was observed for 5 samples out of 16 (31%) (Table 4B). Mutations in *pmrABC*, corresponding to single nucleotide mutations, duplication or transposon insertion into promoter, were detected in 9 out of 11 samples (82%) for which the PMB MIC was increased at the end of TK experiments (Table 5). Although different from that which confers AB122-D12 resistance (p.21_22insCILIFSVILG), these mutations appeared in the same operon.

For AB122-D12, a ≥4-fold increase in MIC compared with control values was observed for 11% (2/18) and 19% (5/26) of samples in the absence and presence of mucin, respectively (Tables 4A and 4B). Mutations in *lpxACD* genes in addition to the 10 amino acid insertion in *pmrB* were detected in 4 of the 7 samples (57%) for which the PMB MIC was increased at the end of TK experiments (Table 5). For two samples (128mg/L replicates 1 & 2), two mutations in *lpxA* were found, with no significant elevation of MIC values compared to control.

5. TABLES & FIGURES

Table 1 : *Parameter estimates of the Emax model describing the relationship between fu_m and PMB total concentrations in presence of mucin*		
Parameter	Description (Unit)	Value (Variance)
E0	Minimum PMB fu_m value	0.061 (0.0004)
Imax	Maximum PMB fu_m increase	0.56 (0.0009)
IC_{50}	PMB total concentration needed to reach 50% of the maximum fu_m (mg/L)	114.37 (196)
ε	Hill coefficient	1.97 (0.252)

Table 2 : *MIC values for different medium [mg/L]*			
MIC [mg/L]	**CAMHB**	**CAMHB + 1% mucin**	**CAMHB + 1% mucin** **MIC_u (corrected by fu_m)**
AB121-D0	1	64	13
AB122-D12	32	1024	628

Table 3: PK/PD model parameter estimates for AB121-D0 and AB122-D12. CI: Confidence Interval; PMB: polymyxin B. The 95% CI was obtained by Sampling Importance Resampling (SIR).

AB121-D0			
Parameter	Description (Unit)	Estimate (95% CI)	
		w/o mucin	***with mucin***
INOC	Initial inoculum (Log10 CFU/mL)	5.98 (5.89 to 6.08)	
BMAX	Maximum bacterial population size (Log10 CFU/mL)	8.47 (8.35 to 8.59)	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum (Log10)	-4.63 (-4.87 to -4.39)	
K_{net}	Apparent growth rate constant (h^{-1})	2.69 (2.58 to 2.80)	
Slope	Kill rate constant of PMB effect for susceptible subpopulation (L/(mg*h))	29.9 (25.0 to 36.2)	
$Emax_R$	Maximum rate constant of PMB effect for resistant subpopulation (h^{-1})	2.70 (2.60 to 2.82)	3.74 (3.60 to 3.87)
EC_{50R}	PMB unbound concentration needed to reach 50% of Emax for resistant subpopulation (mg/L)	0.41 (0.40 to 0.43)	
σ	Additive residual error on log10 scale for total bacteria count (Log10 CFU/mL)	0.35 (0.31 to 0.40)	

AB122-D12			
Parameter	Description (Unit)	Estimate (95% CI)	
		w/o mucin	***with mucin***
INOC	Initial inoculum (Log10 CFU/mL)	5.45 (5.33 to 5.56)	
BMAX	Maximum bacterial population size (Log10 CFU/mL)	8.14 (8.05 to 8.23)	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum (Log10)	-4.19 (-4.58 to -3.84)	
K_{net}	Apparent growth rate constant (h^{-1})	2.42 (2.18 to 2.70)	1.34 (1.15 to 1.52)
$Emax_S$	Maximum rate constant of PMB effect for susceptible subpopulation (h^{-1})	33.4 (26.9 to 40.4)	
$Emax_R$	Maximum rate constant of PMB effect for resistant subpopulation (h^{-1})	2.61 (2.32 to 2.92)	
EC_{50}	PMB unbound concentration needed to reach 50% of Emax for both S & R subpopulations (mg/L)	73.3 (67.3 to 79.5)	384 (342 to 437)
γ	Hill coefficient on PMB effect	3.03 (2.64 to 3.48)	
σ	Additive residual error on log10 scale for total bacteria count (Log10 CFU/mL)	0.33 (0.28 to 0.39)	

Table 4A: MIC values (mg/L) determined at the end (T30h) of **TK experiments conducted in CAMHB**.

Parental strain	PMB unboundconcentrations in TK tubes from which bacteria were sampled	TK Replicate 1	TK Replicate 2	TK Replicate 3	TK Replicate 4
AB121-D0	Control* (0 mg/L)	1	0.5	0.25	0.25
	0.5 mg/L	0.5	>16	8	>16
	1 mg/L	1	0.5	0.25	8
	4 mg/L	>16	>16		
AB122-D12	Control* (0 mg/L)	64	256	64	128
	8 mg/L	64	32	64	64
	16 mg/L	256	64	64	256
	32 mg/L	64	256	64	128
	64 mg/L	128	128	64	
	128 mg/L	128	64	256	

Table 4B: MIC values (mg/L) determined at the end (T30h) of **TK experiments conducted in CAMHB with 1% mucin**.

Parental strain	PMB unbound concentrations in TK tubes from which bacteria were sampled	TK Replicate 1	TK Replicate 2	TK Replicate 3	TK Replicate 4
AB121-D0	Control* (0 mg/L)	0.5	0.5	0.25	0.25
	0.03 mg/L	0.5	1	0.5	0.25
	0.06 mg/L	0.5	0.25	0.5	0.25
	0.25 mg/L	0.5	0.25	>16	8
	0.5 mg/L		>16	>16	0.25
	13 mg/L				>16
AB122-D12	Control* (0 mg/L)	64	128	64	128
	0.5 mg/L	64	128	64	64
	1.2 mg/L	64	128	64	128
	3.3 mg/L	64	64	64	256
	13 mg/L	64	256	128	>512
	48 mg/L	64	512	64	256
	135 mg/L	256	256	512	512
	304 mg/L			128	256

**Control MICs were determined at T30h of TK experiments in the absence of antibiotic.*

Table 5: Relevant mutations detected from AB121-D0 and AB122-D12 at the end of TK experiments **MIC fold-change were calculated regarding control value of respective replicate*

Parental strain	Medium in TK tubes from which bacteria were sampled	PMB unbound concentrations in TK tubes from which bacteria were sampled	TK Replicate n°	MIC fold-change*	Mutation type		Mutated gene	Protein associated
AB121-D0	**CAMHB**	**0.5 mg/L**	2	>32	Arg263His	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
			3	32	ISAba1 insertion in promoter	Insertion	*pmrC_3*	phosphoethanolamine--lipid A transferase
			4	>64	Asn353Tyr	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
	CAMHB	**1 mg/L**	4	32	16.25dup	Duplication	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
	CAMHB	**4 mg/L**	2	>32	Pro170Leu	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
	CAMHB + 1% mucin	**0.25 mg/L**	3	>64	Phe164Ile	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
	CAMHB + 1% mucin	**0.5 mg/L**	2	>32	Pro170Leu	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
			3	>64	Arg231Leu	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
	CAMHB + 1% mucin	**13 mg/L**	4	>64	Ala227Val	Missense	*pmrB*	Signal transduction histidine kinase
AB122-D12	**CAMHB**	**16 mg/L**	1	4	Arg258Leu	Missense	*lpxA*	acyl-ACP--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase
	CAMHB	**128 mg/L**	1	2	Trp206Arg Thr210Ala	Missense	*lpxA*	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase
			2	0.25	Trp206Arg Thr210Ala	Missence	*lpxA*	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase
	CAMHB + 1% mucin	**48 mg/L**	2	4	Ser224Pro	Missense	*lpxA*	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase
	CAMHB + 1% mucin	**135 mg/L**	3	8	ISAba13 insertion in promoter	Insertion	*lpxC*	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase
			4	4	ISAba13 insertion in promoter	Insertion	*lpxC*	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase

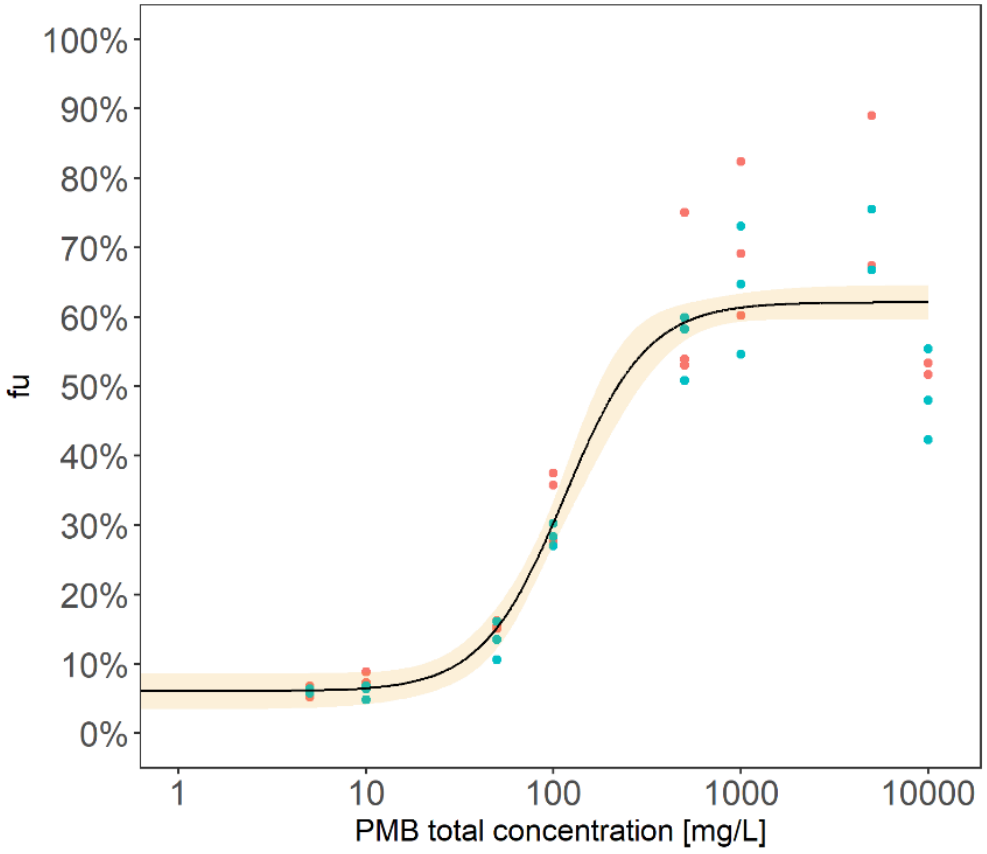
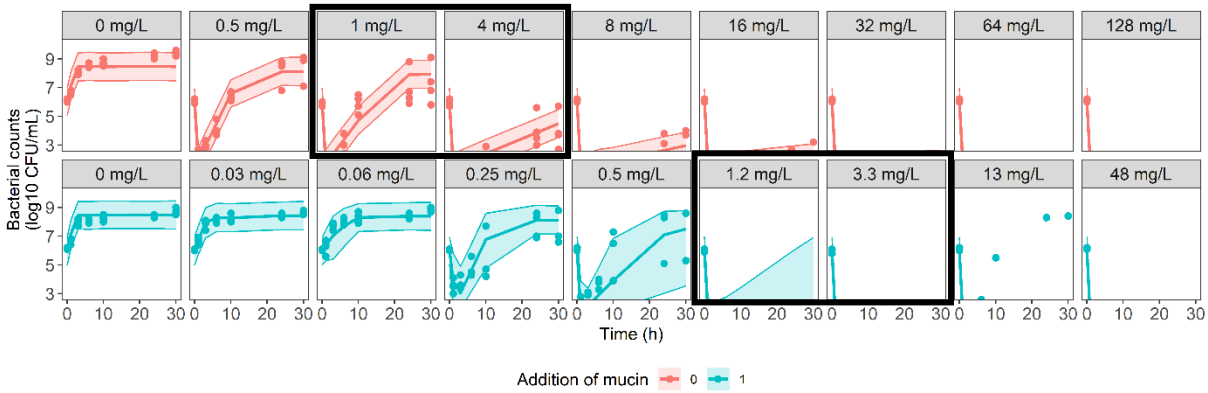


Figure 1: *Relationship between PMB unbound fraction (fu_m) [%] and PMB total concentration [mg/L]. Red and turquoise dots correspond to fu_m values calculated as the ratios of PMB unbound to total concentrations in presence of 1% autoclaved and non-autoclaved mucin, respectively. The solid line represents the fit of the sigmoidal Emax function (Equation 1, $R^2 = 0.92$) and the yellow coloured area the 90% confidence interval.*

AB121-D0



AB122-D12

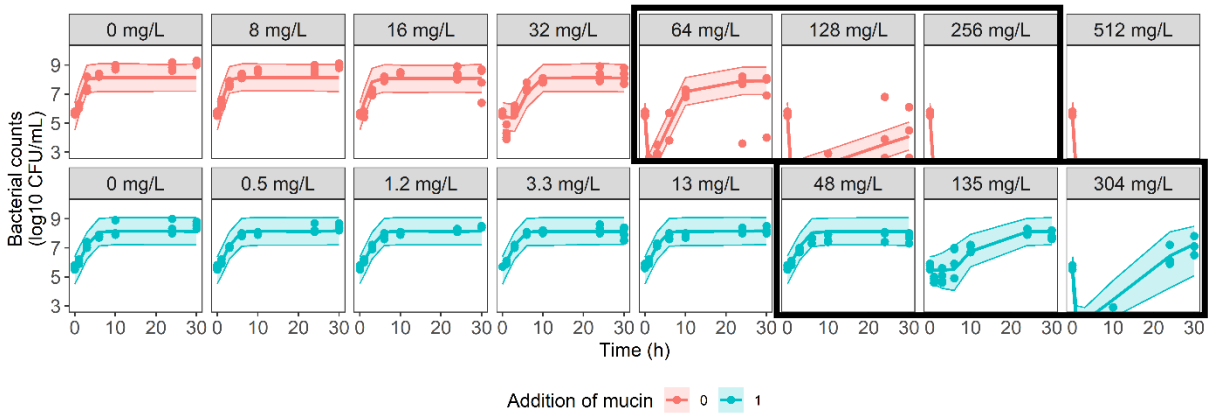


Figure 2: *Visual predictive checks of the final models. Circles represent experimental data, solid lines depict the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1,000 simulated profiles. Red: data without mucin. Turquoise: data with 1% mucin. The PMB concentrations indicated represent PMB unbound concentrations in TK experiments.*

6. DISCUSSION

This study has demonstrated by ultracentrifugation that PMB binding to mucin was saturable, which could not be observed in previous studies performed with a single PMB concentration [14]. The initially low and stable f_{u_m} for total PMB concentrations up to ≈20 mg/L then increased non-linearly with concentrations, reaching a maximum value of 60% for concentrations higher than 200 mg/L. The unbound PMB fraction of 15% previously determined by the dialysis method for a PMB concentration of 40 mg/L was consistent with the value of 12% estimated using the relationship established in this study between f_{u_m} and total PMB concentrations (Eq. 1). However, for PMB concentrations encountered in clinical practice, up to 10 mg/L [26], more than 90% of PMB would be bound to mucin. Only the unbound drug concentration can drive pharmacological activity. Therefore, for antibiotics showing strong binding to substances found in the airways, such as PMB, it is important to correct observed pulmonary concentrations by multiplying with f_{u_m} in the relevant matrix. These calculated unbound concentrations should be a better predictor of efficacy than total concentrations, which would over predict the efficacy of a given dose and consequently result in the under prediction of the efficacious human dose. However, mucin represents only one of the components of mucus and additional mucus components such as lipids or DNA might also contribute to drug binding *in vivo*, as observed for tobramycin [13,27]. Therefore, the PMB binding measured in this study may be underestimated and need to be validated with *in vivo* data.

Yet, determining binding for a wide range of PMB concentrations, largely exceeding those encountered clinically, allowed to correct the MICs and the concentrations tested in TK experiments (ranging from 0.5 to 1024 mg/L) by multiplying them by the appropriate f_{u_m} value, and therefore to express all concentrations as unbound and thus active concentrations, in order to better characterize the *in vitro* PMB antimicrobial effect against the two *A. baumannii* strains in presence of mucin. First, we observed that the MIC ratios in the absence and presence of mucin went from 64 to 13 for AB121-D0 and from 32 to 20 for AB122-D12 after correction of total concentrations by f_{u_m}. Although these MIC ratios were reduced, they remained well above 1, suggesting that in addition to PMB binding, mucin would inhibit PMB antimicrobial activity against these two *A. baumannii* strains, as previously observed with

fluoroquinolones [13] which, despite 100% f_{u_m}, showed reduced activity against *P. aeruginosa* in the presence of mucin.

The impact of mucin on PMB activity was then quantified using a PK/PD modelling approach. The PK/PD models developed in this study allowed to well characterize the TK data obtained in CAMHB with and without mucin. However, the decrease in PMB activity by mucin, assumed by the increase in MICs, was only confirmed for AB122-D12 with a decrease of the initial CFU decay with time as well as an increase of the bacterial regrowth in presence of mucin, resulting in a 5-fold increase of EC_{50} for both S and R sub-populations in presence of mucin. Furthermore, an effect of mucin on the growth rate of AB122-D12, in addition to its impact on PMB activity, was observed with a 2-fold decrease between the values of K_{net} in the absence and presence of mucin. On the contrary, an increase in PMB activity, not consistent with MIC results, was observed for AB121-D0 in the presence of mucin with a reduction of the apparent bacterial regrowth, resulting in an increase in Emax for the R sub-population of AB121-D0 by a factor of 1.4 between the values in absence and presence of mucin. No mucin effects on the S sub-population or on the growth rate of AB121-D0 were observed. Different behaviors between these two strains have also been observed previously when investigating the impact of the nutrient concentration in CAMHB on PMB activity, but without any mechanistic explanation.

Bacterial regrowth observed after an initial CFU decay in TK experiments was associated with an increase of the MIC by a factor ≥ 4 for 42% and 16% of samples collected at T30h for AB121-D0 and AB122-D12, respectively, with variability appearing between replicates for a same PMB concentration tested. Mutations in genes conferring resistance were detected in 82% for AB121-D0 and 57% for AB122-D12 of sample for which the PMB MIC was increased at the end of TK experiments.

When identified, mutations for AB121-D0 corresponded always to modifications of *pmrABC* operon through single nucleotide mutations, duplication or transposon insertion into promoter (Table 4). These modifications in the same operon of AB122-D12, are known to confer PMB resistance through constitutive *eptA* expression reducing the overall net-negative charge of the membrane by lipid A modification [28]. For AB122-D12, sequencing highlighted

mutations inducing inhibition of LOS synthesis by the impairment of *lpxACD,* which prevent the fixation to bacterial membrane [29]. The identification of mutations in only part of the bacterial samples, collected in the presence of regrowth, suggested the involvement of other resistance mechanisms.

The PK/PD modelling approach based on TK allowed to describe well the data and differentiate between the impacts of the mucin on PMB binding, on bacterial growth and on killing kinetics over the entire experiment time course, which cannot be achieved by traditional MIC determination. However, it is worth to remember that the semi-mechanistic PK/PD model with hetero-resistance used in this study remains essentially a mathematical tool, probably too simplistic by only considering two homogenous sub-populations, especially as the mechanistic data generated by sequencing in this study identified the “R” subpopulation only for certain replicates of TK tube. Thus, semi-mechanistic PD modelling can therefore be used to describe but not to explain, or a fortiori to predict, the differences observed between strains, for which further studies are warranted.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Agnès Audurier and Laure Prouvensier for their technical assistance, Vincent Aranzana-Climent for his advices in modelling and Luc Deroche for is help in sequencing.

The authors thank also the INSERM unit U1313 for the centrifuge using.

FUNDING

Mathilde Lacroix received a CIFRE fellowship founded in part by National Association for Research and Technology (ANRT), on the behalf of the French Ministry of Higher Education and Research, and in part by Institut Roche

7. REFERENCES

[1] Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, et al. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med 2005;31:649–55. https://doi.org/10.1007/s00134-005-2598-0.

[2] Mohd Sazlly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. The global prevalence of multidrug-resistance among Acinetobacter baumannii causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. J Infect 2019;79:593–600. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.09.012.

[3] Ghafur A, Ramakrishnan B, Devarajan V, Easow J, Sreenivas S, Devaprasad D, et al. Retrospective Study of Nephrotoxicity Rate among Adult Patients Receiving Colistin Compared to β-lactam Antibiotics. Indian Journal of Critical Care Medicine 2019;23:518–22. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-23276.

[4] Bos AC, Passé KM, Mouton JW, Janssens HM, Tiddens HAWM. The fate of inhaled antibiotics after deposition in cystic fibrosis: How to get drug to the bug? J Cyst Fibros 2017;16:13–23. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2016.10.001.

[5] Morrison CB, Markovetz MR, Ehre C. Mucus, Mucins and Cystic Fibrosis. Pediatr Pulmonol 2019;54:S84–96. https://doi.org/10.1002/ppul.24530.

[6] Henderson AG, Ehre C, Button B, Abdullah LH, Cai L-H, Leigh MW, et al. Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. J Clin Invest 2014;124:3047–60. https://doi.org/10.1172/JCI73469.

[7] Marczynski M, Kimna C, Lieleg O. Purified mucins in drug delivery research. Advanced Drug Delivery Reviews 2021;178:113845. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113845.

[8] Batson BD, Zorn BT, Radicioni G, Livengood SS, Kumagai T, Dang H, et al. Cystic Fibrosis Airway Mucus Hyperconcentration Produces a Vicious Cycle of Mucin, Pathogen, and Inflammatory Interactions that Promotes Disease Persistence. Am J Respir Cell Mol Biol 2022;67:253–65. https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0359OC.

[9] Dhanisha SS, Guruvayoorappan C, Drishya S, Abeesh P. Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2018;122:98–122. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.12.006.

[10] Niibuchi J-J, Aramaki Y, Tsuchiya S. Binding of antibiotics to rat intestinal mucin. International Journal of Pharmaceutics 1986;30:181–7. https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90077-3.

[11] Bhat PG, Flanagan DR, Donovan MD. Drug binding to gastric mucus glycoproteins. International Journal of Pharmaceutics 1996;134:15–25. https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04333-0.

[12] Mucus and Mucin Environments Reduce the Efficacy of Polymyxin and Fluoroquinolone Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa - PMC n.d. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9267971/ (accessed March 15, 2023).

[13] Samad T, Co JY, Witten J, Ribbeck K. Mucus and Mucin Environments Reduce the Efficacy of Polymyxin and Fluoroquinolone Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa. ACS Biomater Sci Eng 2019;5:1189–94. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01054.

[14] Huang JX, Blaskovich MAT, Pelingon R, Ramu S, Kavanagh A, Elliott AG, et al. Mucin Binding Reduces Colistin Antimicrobial Activity. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:5925–31. https://doi.org/10.1128/AAC.00808-15.

[15] Jaidane N, Naas T, Mansour W, Radhia BB, Jerbi S, Boujaafar N, et al. Genomic analysis of in vivo acquired resistance to colistin and rifampicin in Acinetobacter baumannii. International Journal of Antimicrobial Agents 2018;51:266–9. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.016.

[16] EUCAST_SOP_10.2_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20211202.pdf n.d.

[17] M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute n.d. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/ (accessed March 7, 2023).

[18] Cheah S-E, Wang J, Nguyen VTT, Turnidge JD, Li J, Nation RL. 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 2015:dkv267. https://doi.org/10.1093/jac/dkv267.

[19] Chauzy A, Akrong G, Aranzana-Climent V, Moreau J, Prouvensier L, Mirfendereski H, et al. PKPD Modeling of the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B in vivo. Front Pharmacol 2022;13:842921. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842921.

[20] Dimitrijevic D, Fabian E, Funk-Weyer D, Landsiedel R. Rapid equilibrium dialysis, ultrafiltration or ultracentrifugation? Evaluation of methods to quantify the unbound fraction of substances in plasma. Biochem Biophys Res Commun 2023;651:114–20. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.02.021.

[21] Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001;28:481–504. https://doi.org/10.1023/a:1012299115260.

[22] Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Study of the stability of polymyxins B(1), E(1) and E(2) in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2002;29:203–12. https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00016-x.

[23] Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:733–8.

[24] Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2016;43:583–96. https://doi.org/10.1007/s10928-016-9487-8.

[25] Nguyen THT, Mouksassi M-S, Holford N, Al-Huniti N, Freedman I, Hooker AC, et al. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 2017;6:87–109. https://doi.org/10.1002/psp4.12161.

[26] Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J, Boniatti MM, Dalarosa MG, Falci DR, et al. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. Clin Infect Dis 2013;57:524–31. https://doi.org/10.1093/cid/cit334.

[27] Keemink J, Cantrill C, Riboulet W, Jurmanović S, Pavlovski I, Bissantz C. Estimating Unbound Drug Concentrations in Simulated Human Lung Fluid: Relevance to Lung Antibiotic PKPD. Molecular Pharmaceutics 2023. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00208.

[28] Janssen AB, Schaik W van. Harder, better, faster, stronger: Colistin resistance mechanisms in Escherichia coli. PLOS Genetics 2021;17:e1009262. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009262.

[29] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4971–7. https://doi.org/10.1128/AAC.00834-10.

[30] Beal SL. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001;28:481–504. https://doi.org/10.1023/A:1012299115260.

[31] Dosne A-G, Bergstrand M, Karlsson MO. Application of Sampling Importance Resampling to estimate parameter uncertainty distributions 2013.

8. SUPPLEMENTAL MATERIAL

LC-MS/MS PROCEDURE

Briefly, 0.2 mL of sample added to 0.05 mL of drug-free plasma, were mixed with 0.75 mL of phosphate buffer (pH 7.2) and 0.02 mL of internal standard (colistin sulfate; Merck KGaA) at 6.25 mg/L for plasma. The samples were briefly vortexed and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatants (0.950 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 first with 1 mL of water and then with 1 mL of a solution of methanol/water (50/50). Columns were 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, and were quantified with a quadratic regression mode. The intraday variability was characterized at three levels (0.15, 1.5 and 7.5 mg/L) with a precision and bias of <20% for the lowest level, and < 15% for the others.

PK/PD MODELLING

1. Bacterial growth sub-model

A previously described semi-mechanistic model with hetero-resistance [1], i.e. two bacterial sub-populations with S representing the susceptible and R the resistant bacterial sub-populations to PMB, was used to describe the time course of bacterial counts (CFU/mL) for the two *A. baumannii* strains. Briefly, a logistic growth model with one compartment for each bacterial sub-population was used to describe the self-limited bacterial growth in absence of antibiotic (Equations S1 and S2).

$$\frac{dS}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times S \quad \text{(Eq. S1)}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times R \quad \text{(Eq. S2)}$$

Where K_{net} (h^{-1}) is the apparent growth rate constant and BMAX (CFU/mL) is the maximal capacity of the system.

2. Drug effect sub-model

PMB was assumed to have an effect on total bacteria.

$$\frac{dS}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times S - Kill\ rate_S \times S \quad \text{(Eq. S4)}$$

$$\frac{dR}{dt} = k_{net} \times \left(1 - \frac{S+R}{BMAX}\right) \times R - Kill\ rate_R \times R \quad \text{(Eq. S5)}$$

Where Kill $rate_S$ and Kill $rate_R$ (h^{-1}) are the killing rates of S and R respectively. Multiple functions for each kill rate were tested: a linear function ($Kill\ rate = Slope \times C$), a power function ($Kill\ rate = Slope \times C^{\gamma}$), an Emax function ($Kill\ rate = \frac{Emax \times C}{EC_{50} + C}$) or a sigmoidal Emax function ($Kill\ rate = \frac{Emax \times C^{\gamma}}{EC_{50}{}^{\gamma} + C^{\gamma}}$). The final equation describing PMB kill rate for each strain and subpopulation were the following:

For AB121-D0

$$Kill\ rate_S = Slope \times C \quad \text{(Eq. S6)}$$

$$Kill\ rate_R = \frac{Emax_R \times C}{EC_{50_R} + C} \quad \text{(Eq. S7)}$$

For AB122-D12

$$Kill\ rate_S = \frac{Emax_S \times C^\gamma}{EC_{50}{}^\gamma + C^\gamma} \quad \text{(Eq. S8)}$$

$$Kill\ rate_R = \frac{Emax_R \times C^\gamma}{EC_{50}{}^\gamma + C^\gamma} \quad \text{(Eq. S9)}$$

Where *Slope* is a second-order kill rate constant (L/(mg*h)), Emax (h^{-1}) represents the maximum kill rate due to PMB, EC_{50} (mg/L) corresponds to PMB concentration needed to reach 50% of the maximum effect, C (mg/L) to the PMB concentration and γ to the Hill coefficient.

3. Estimation and evaluation methods

Model selection was based on objective function value (OFV) and goodness of fit plots. Visual predictive checks (VPCs) based on 1000 simulations were drawn to evaluate the fit to data and taken into account for model selection.

Bacterial count data were transformed into decimal logarithms before parameter estimation.

Data below the LOQ were taken into account in the model estimation by applying Beal's M3 method [2]. Uncertainty around population parameter estimates was estimated using the sampling importance resampling (SIR) technique. SIR options were –samples = 1000,1000,1000,2000 -resamples=200,400,500,1000 and results were considered final when the degrees of freedom (ddf) of SIR dOFV distribution reached the ddf of the theoretical dOFV distribution as described in [3].

Dataset preparation was performed using R software, parameter estimation was performed using NONMEM software (ICON, Dublin, Ireland) version 7.4.2 using the LAPLACIAN algorithm.

SEQUENCING

Genomic DNA (gDNA) was extracted from overnight cultured using QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Total extracted gDNA was quantified using a Nanodrop One (Thermofischer Scientific, Waltham, MA, USA). Long-read sequencing was performed during 24h using a MinION sequencer (Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, UK), ligation sequencing kit SQK-LSK109 (ONT) and flow cell FLO-MIN106 R9.4.1 (ONT) as previously described [8]. Basecalling of raw data (FAST5 format) was performed using guppy (ONT; v5.0.17) in Super-Accurate mode (Qscore C 10). Filtlong (v0.2.1) was used to remove all short fragments [4]. Genomes were assembled by using Trycycler [5] which combine the *de novo* assembler softwares (flye (v2.9-b1769), miniasm (v0.3-r179) + minipolish (v0.1.3) and raven (v1.8.1) [6–8]). Then, assembled genomes were polished with medaka (ONT; v1.5.0) using defaults settings of the medaka_consensus. program (one round of polishing) Median coverage was 100 for genomes and 130 for plasmides. Gene prediction was performed with the prokka pipeline [9] using *Acinetobacter baumannii* TCDC-AB0715 (GCA_000189735.2) transcript and protein datasets

TABLES & FIGURES

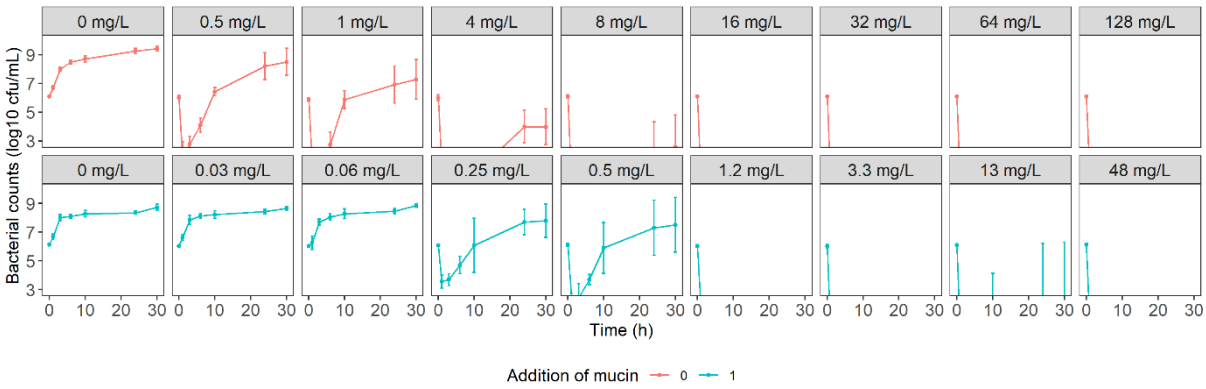
Table S1: *Parameter estimates of the Emax model for data generated with autoclaved mucin, without autoclave and all data pooled in a single dataset (Equation 1)*

Parameter	Pooled data	Autoclaved mucin	Not autoclaved mucin
E0	0.061	0.067	0.056
Imax	0.56	0.56	0.57
IC_{50} (mg/L)	114.37	104.01	126.95
ε	1.97	2.21	1.87
R^2	0.92	0.94	0.90

Table S2: *fu_m (%) simulated from Equation 1 with Table S1 parameters. CI: Confidence Interval*

	Pooled data		Autoclaved mucin		Not autoclaved mucin	
Total conc.	***fu_m* [%] (95% CI)**	**Unbound conc.**	***fu_m* [%] (95% CI)**	**Unbound conc.**	***fu_m* [%] (95% CI)**	**Unbound conc.**
0.5	6.1 (2.1 - 10.0)	0.03	6.7 (0.1 - 13.2)	0.03	5.6 (2.1 - 9.1)	0.03
1	6.1 (2.1 - 10.0)	0.06	6.7 (0.1 - 13.2)	0.07	5.6 (2.1 - 9.1)	0.06
2	6.1 (2.2 - 10.0)	0.12	6.7 (0.1 - 13.2)	0.13	5.6 (2.2 - 9.1)	0.11
4	6.1 (2.3 - 10.0)	0.25	6.7 (0.3 - 13.2)	0.27	5.7 (2.3 - 9.1)	0.23
8	6.4 (2.7 - 10.0)	0.51	6.9 (0.7 - 13.0)	0.55	5.9 (2.7 - 9.1)	0.48
10	6.5 (3.0 - 10.1)	0.65	7.0 (1.0 - 13.0)	0.70	6.1 (3.0 - 9.2)	0.61
50	15.2 (10.7 - 19.7)	7.62	15.9 (7.7 – 24.2)	7.96	14.2 (10.5 – 17.8)	7.08
100	30.4 (25.6 - 35.2)	30.4	33.4 (24.9 – 41.9)	33.4	27.9 (23.8 – 32.1)	27.9
500	59.2 (55.1 - 63.2)	296	60.8 (55.0 - 66.6)	304	58.6 (54.6 - 62.6)	293
1000	61.3 (58.2 - 64.4)	613	62.1 (57.2 – 67.1)	621	61.5 (58.4 – 64.7)	615
5000	62.1 (58.4 - 65.8)	3100	62.5 (57.1 – 67.9)	3120	62.7 (58.6 – 66.7)	3130
10000	62.1 (58.3 - 65.8)	6210	62.5 (57.1 – 68.0)	6250	62.7 (58.6 - 66.9)	6270

AB121-D0



AB122-D12

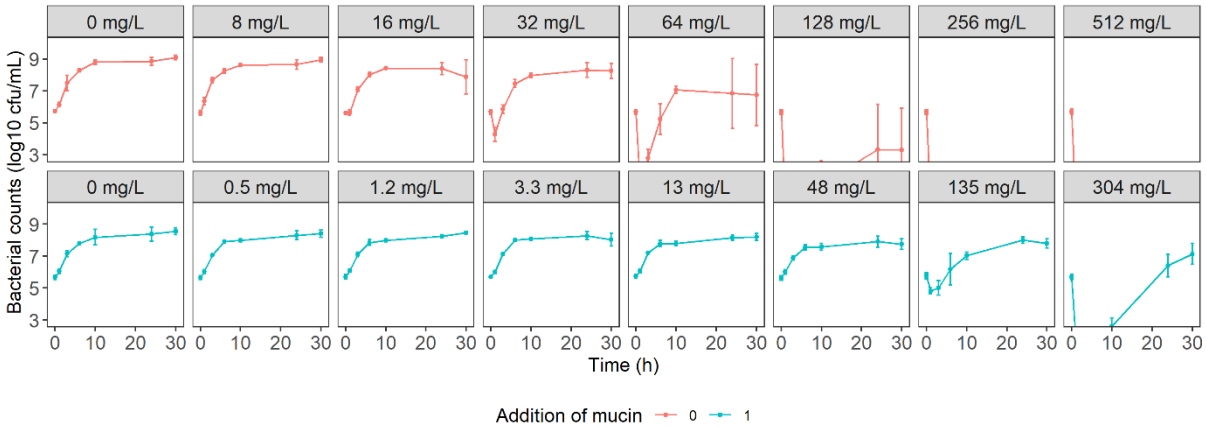


Figure S1: *Time-kill curves of AB121-D0 and AB122-D12. Polymyxin B concentrations are in mg/L. Lines correspond to the mean and error bars to the standard deviation of triplicates.*
Red: data without mucin. Turquoise: data with 1% mucin

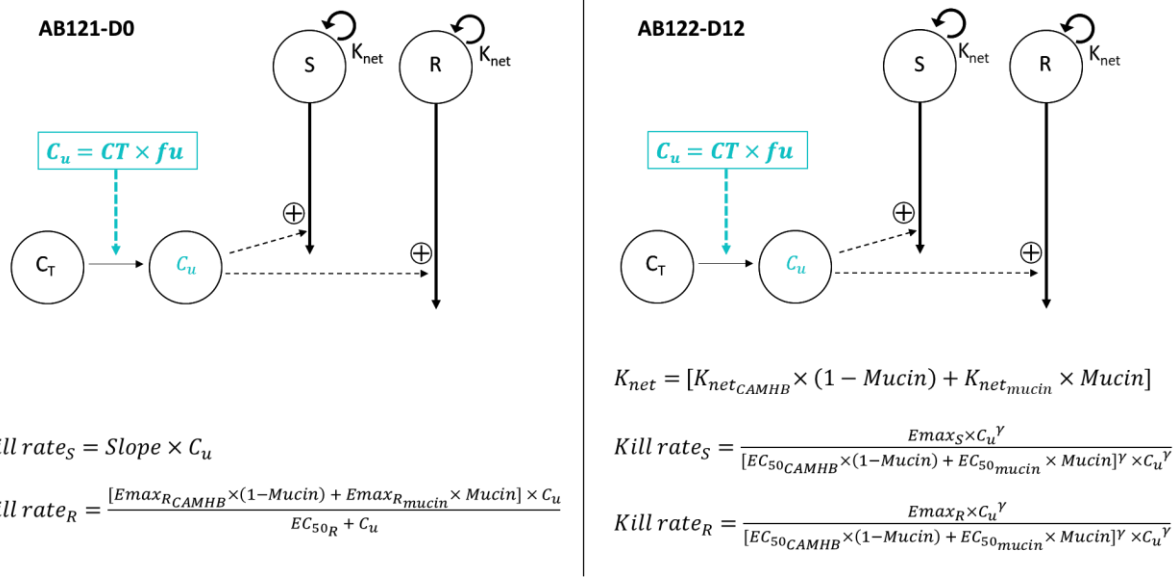
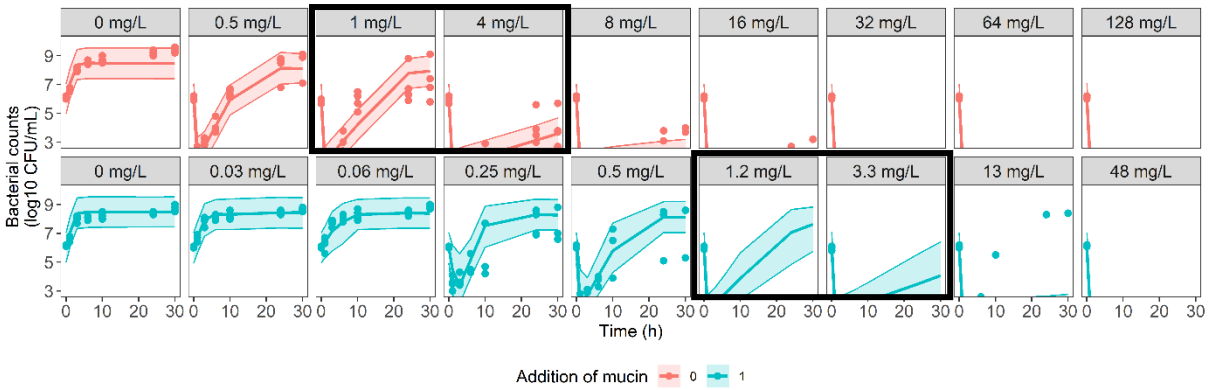


Figure S2: *PK/PD models structure for both strains. K_{net}: apparent growth rate constant (h^{-1}); S: susceptible bacterial subpopulation; R: resistant bacterial subpopulation; C_T and C_u: total and unbound polymyxin B concentrations (mg/L), respectively; Slope: second-order kill rate constant (L/(mg*h)) due to PMB; Emax: maximum kill rate constant due to PMB (h^{-1}); EC_{50}: PMB concentration needed to reach 50% of Emax (mg/L); γ: Hill coefficient. Mucin is equal either to 0 or 1 regarding its absence or presence in TK experiment, respectively. Mucin effect was applied to $Emax_R$ for AB121-D0, and to K_{net} as well as to the EC_{50} common to both bacterial subppulations for AB122-D12.*

AB121-D0



AB122-D12

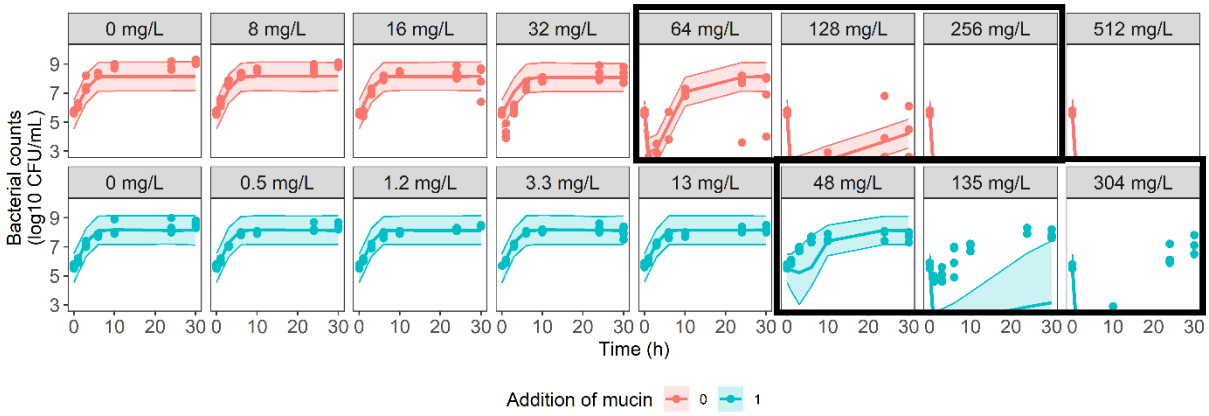
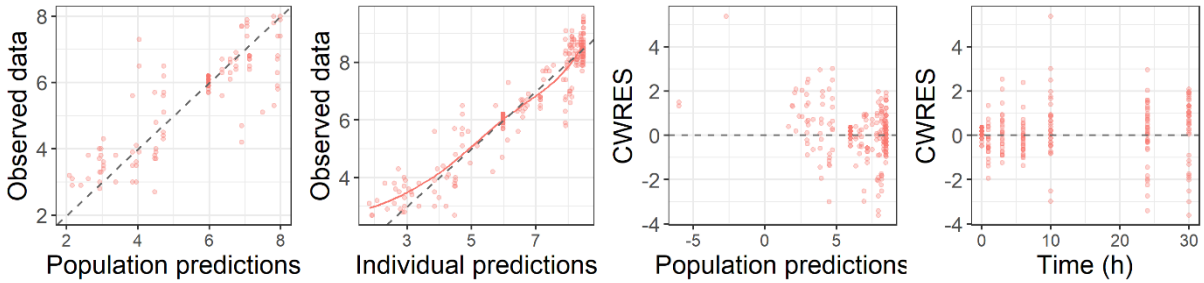


Figure S3: *Visual predictive check of models taking into account only the correction of PMB total concentrations with fu_m and no additional mucin effect. Circles represent experimental data, solid lines depict the median of simulated data and, colored areas depict the 90% prediction interval for 1,000 simulated profiles. Red: data without mucin. Turquoise: data with 1% mucin. The PMB concentrations indicated represent PMB unbound concentrations in TK experiments.*

AB121-D0



AB122-D12

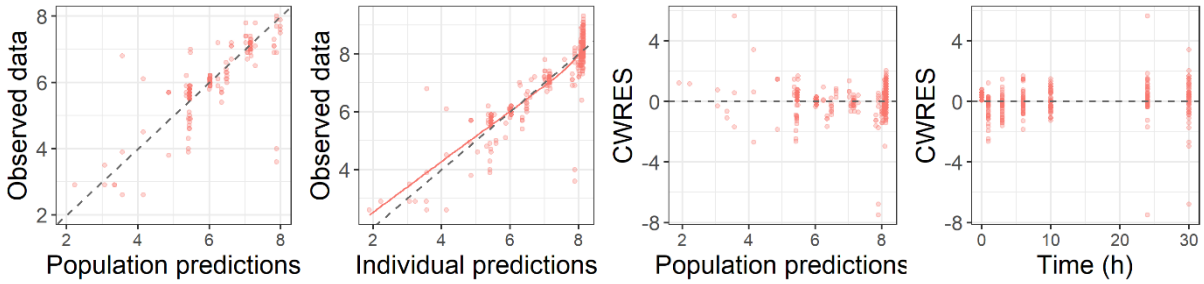


Figure S4: *Goodness of Fit plots (GOF) for AB121-D0 and AB122-D12. CWRES, conditional weighted residuals.*

REFERENCES

[1] Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:733–8.

[2] Beal SL. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. J Pharmacokinet Pharmacodyn 2001;28:481–504. https://doi.org/10.1023/A:1012299115260.

[3] Dosne A-G, Bergstrand M, Karlsson MO. Application of Sampling Importance Resampling to estimate parameter uncertainty distributions 2013.

[4] Wick R. rrwick/Filtlong 2023.

[5] Wick RR, Judd LM, Cerdeira LT, Hawkey J, Méric G, Vezina B, et al. Trycycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes. Genome Biology 2021;22:266. https://doi.org/10.1186/s13059-021-02483-z.

[6] Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. Nat Biotechnol 2019;37:540–6. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8.

[7] Wick RR, Holt KE. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing. F1000Res 2019;8:2138. https://doi.org/10.12688/f1000research.21782.4.

[8] Vaser R, Šikić M. Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. Nat Comput Sci 2021;1:332–6. https://doi.org/10.1038/s43588-021-00073-4.

[9] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 2014;30:2068–9. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153.

Article n°4 : Resistance characterisation of *Acinetobacter baumannii* with Polymyxin B to support *in vitro* semi-mechanistic PK/PD modelling

Article en préparation: *Mathilde Lacroix, Andrej Trauner, Jonathan Clarhaut, Jérémy Moreau, Claudia Zampaloni, Caterina Bissantz, Hamasseh Shirvani, Sandrine Marchand, William Couet, Alexia Chauzy*

Résumé en français :

Les expériences de time-kill (TK) avec *Acinetobacter baumannii* et la polymyxine B (PMB) montrent généralement dans le temps une diminution des CFU suivie d'une repousse, même à des concentrations allant jusqu'à 16xMIC, potentiellement en raison d'un développement de résistance dû à une mutation ou une adaptation phénotypique. Cette dynamique bi-phasique est décrite par des modèles de pharmacodynamie (PD) avec des sous-populations hétérogènes ou une résistance adaptative. L'objectif de cette étude était d'utiliser la transcriptomique pour caractériser la résistance adaptative *in vitro* d'*A. baumannii* exposé à la PMB, afin d'enrichir la modélisation PK/PD semi-mécanistique.

Deux isolats cliniques d'*A. baumannii* : sensible (AB121-D0) et résistant (AB122-D12) obtenus avant et après un traitement à la colistine ont été utilisés pour réaliser des expériences de TK (3 réplicats). Les concentrations de PMB montrant une diminution des UFC suivie d'une repousse rapide après 1h ont été sélectionnées pour les deux souches (1 mg/L pour AB121-D0 et 32 mg/L pour AB122-D12). Des aliquots de 2mL de cultures bactériennes ont été récoltées à t = 0, 1, 2, 4 heures. L'ARN a été extrait et appauvri en ARN stables (ARNr/ARNt) avant séquençage. L'analyse des données a été réalisée à l'aide des R packages : EdgeR et de WGCNA, afin d'identifier les profils d'expression géniques spécifiques à chaque souche, et au traitement. La fixation de la PMB sur les membranes bactériennes pendant les expériences de TK a été évaluée à l'aide d'un marquage avec de la PMB-rhodamine et d'un microscope confocale.

Malgré des profils de courbe de TK similaires entre les deux souches, les tendances d'expression globale des gènes étaient spécifiques à chaque souche. Pour AB121-D0, les

résultats indiquent un métabolisme/catabolisme actif des composants membranaires et suggèrent un ou des mécanismes d'adaptation à la PMB liés au remodelage des membranes bactériennes. En revanche, pour AB122-D12, la plupart des gènes surexprimés étaient associés à la transcription/traduction et à la régulation osmotique. Les résultats de la microscopie confocale ont montré qu'AB122-D12 présentait différentes sous-populations de bactéries en ce qui concerne la fixation de la PMB sur les membranes. Bien que ces sous-populations n'aient pas été sélectionnées de manière préférentielle au cours des expériences TK par le traitement à la PMB. Par conséquent, les résultats pour AB122-D12 suggèrent une combinaison entre hétéro-résistance et le déclenchement de mécanismes d'adaptation qui restent encore à identifier.

Cette étude a montré que la transcriptomique peut fournir des arguments pour orienter le choix de la structure des modèles PD. Cependant, l'importance relative des différentes mécanismes mis en évidence ainsi que leurs interconnexions potentielles reste difficile à évaluer et à intégrer dans les modèles PK/PD.

Resistance characterisation of *Acinetobacter baumannii* with Polymyxin B to support *in vitro* semi-mechanistic PK/PD modelling

Mathilde Lacroix [1, 2], Andrej Trauner [3a], Jonathan Clarhaut [2,4], Jérémy Moreau [2], Claudia Zampaloni [3a], Caterina Bissantz [3b], Hamasseh Shirvani [1], Sandrine Marchand [2,5], William Couet [2, 5], Alexia Chauzy [2#]

[1] Institut Roche - Boulogne-Billancourt (France)
[2] Université de Poitiers, INSERM U1070, PHAR2 - Poitiers (France)
[3] Roche Pharma Research and Early Development, [a] Immunology, Infectious Disease and Ophthalmology, [b] Pharmaceutical Sciences, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
[4] CHU Poitiers - Poitiers (France)
[5] CHU Poitiers, Département de Pharmacocinétique et Toxicologie - Poitiers (France)

[#] **Corresponding author**:

Alexia CHAUZY

alexia.chauzy@univ-poitiers.fr

INSERM U1070 - Université de Poitiers

Pôle Biologie Santé - Bâtiment B36

1 rue Georges Bonnet

86022 POITIERS Cedex, France

1. ABSTRACT

Time-kill experiments (TK) with *Acinetobacter baumannii* and polymyxin B (PMB), usually show CFU decrease followed by regrowth, even at concentrations up to 16xMIC, potentially due to mutation-driven resistance or phenotypic adaptation. This dynamic is described by PD models with heterogeneous subpopulations or adaptive resistance. The aim of this study was to use transcriptomics to characterize the adaptive resistance of *A. baumannii* exposed to PMB *in vitro*, to inform semi-mechanistic PK/PD modelling.

Two clinical *A. baumannii* isolates: susceptible (AB121-D0) and resistant (AB122-D12) obtained before and after colistin treatment were used to perform TK experiments (3 replicates). PMB concentrations showing bacterial decrease and rapid regrowth at 1h were selected for both strains (1 mg/L for AB121-D0 and 32 mg/L for AB122-D12). 2mL aliquots of bacterial cultures were harvested at t = 0, 1, 2, 4 hours. Bulk RNA was extracted and depleted of stable RNAs (rRNA/tRNA) prior to sequencing. Data analysis was performed using EdgeR and WGCNA to identify strain- and treatment-specific expression patterns. PMB fixation to bacterial membranes during TK experiments was assessed with labelled PMB-rhodamine and confocal microscope.

Despite similar TK curve profiles with initial CFU decay followed by regrowth, trends in global expression modulation were specific to each strain. For AB121-D0, results indicates an active metabolism/catabolism of membranes components, and suggested adaptation mechanism(s) related to membrane remodelling regarding PMB treatment. In contrast, for AB122-D12 most of the genes overexpressed were associated with the transcription/translation and osmotic regulation pathways. Confocal microscopy results showed that AB122-D12 displayed different bacteria subpopulations regarding PMB fixation to the membranes, although these subpopulations were not preferentially selected during TK experiments time course. Therefore, results for AB122-D12 suggested a combination between hetero-resistance and the triggering of adaptation mechanisms, which still remain to be identified.

This study has shown that transcriptomics may provide evidences to support the choice of PD models structure. However, the relative importance of the various highlighted pathways as well as their potential interconnections may be challenging to assess and to implement into PK/PD models.

2. INTRODUCTION

Antibiotics antimicrobial efficacy is assessed thanks to pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) studies. The PK/PD relationship is determined through *in vitro* tests and/or in *in vivo* infection models. By complementing these studies with human PK data, and by Monte Carlo simulations, dosing regimens can be established by trying to prevent emergence of bacterial resistance (1). Semi-mechanistic PK/PD modelling is often based on *in vitro* experiments under static conditions typically time-kill (TK) experiments, or in dynamic such as in Hollow Fiber Infection Model (HFMI) (2). However, during *in vitro* experiments, especially when Gram negative bacteria are studied, CFU decrease followed by regrowth is often observed (3–5). This phenomenon is generally modelled by two types of PD models. First, the hetero-resistance model (S/R) where a pre-existing bacterial population is already present in the starting inoculum. In this model type, the resistant sub-population will be selected over time over the more susceptible one (6, 7). Second, the adaptation model, for which the initial bacterial population will adapt over time to the compound and therefore reduce its antimicrobial activity (8, 9). The adaptive resistance is by definition reversible and triggered by the antibiotic. When data are modelled, model selection is based on mathematical criteria such as the objective function (OFV) or AKAIKE test, or on graphical diagnostic with Goodness of Fit (GOF) plots. However most of the time, due to statistical criteria and in accordance with the parsimony rule, the S/R model is predominantly selected independently of the biological "reality" (10). This can be the source of major concern when results are extrapolated for longer experiments or with human PK, as they could lead to misinterpretations or errors. PD model structure can also be selected thanks to additional microbiology tests as for example sequential time-kill (11), which consists of two consecutive TK experiments and curves profiles from the second TK can orientate on the choice of model structure. Another way to select PK/PD model is to generate mechanistic data describing bacterial resistance. Two common ways to assess if pre-existing resistant bacteria are present in an inoculum are the population analysis profile (PAPs) and genome sequencing. Indeed mutations or resistance inductors genes such as bla_{oxa48} or bla_{KPC-2} for carbapenems (12), *mcr* and *pmrABCDE* for polymyxins (13) or *gyrAB* and *parC* for fluoroquinolones (14) have been reported. If mutations are not identified before the experiment, they can appear as a result

of antibiotic pressure. However, they are not always observed during *in vitro* experiments despite the consistent bacterial regrowth observed. Which seems to indicate that if mutations can sometimes explain the bacterial resistance, adaptation mechanisms are more consistently triggered in *in vitro* experiments especially at concentrations close to the MIC. Adaptation mechanisms are often mediated by genes expression modulation and can be studied through the analysis of bacterial mRNA changing expression regarding established conditions by RT-qPCR or RT-dPCR when genes have already been identified and selected, or by transcriptomic analysis for a more global approach.

The bacteria/antibiotic pair: *Acinetobacter baumannii* /polymyxin B (PMB) is nowadays of clinical relevance as *A. baumannii* is part of ESKAPE group and responsible of worldwide hospital acquired infections such as Urinary tract infection (UTI) or Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) (23, 24). It was cited by World Health Organization (WHO) as critical pathogen with an urgent need of new treatment solutions due to its multi-drug resistance especially to carbapenems (26), and one of the remaining antibiotic classes to treat *A. baumannii* Multi-Drug Resistant (MDR) infections are polymyxins. First discovered in 1947, they were used as treatment against Gram negative bacteria through their properties to form pores in outer and inner membranes after their fixations to lipid A on the lipopolysaccharides (LPS) (27). Gradually abandoned in 1980s due to their nephrotoxic properties (28, 29) and are now used again as last-line antibiotics and listed by WHO among the highest critically important antimicrobials for Human medicine (30).

Adaptation mechanisms have been described by various publications for *A. baumannii* exposed to PMB by an up-regulation of genes involved in efflux system, cell envelope and membrane remodelling especially for lipooligosaccharides (LOS) deficient strains (20–22). Therefore, the aim of this study was to use transcriptomics to characterize the adaptive resistance over time of *A. baumannii* exposed to PMB *in vitro*, to inform semi-mechanistic PK/PD modelling.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Chemical and strains

Polymyxin B (PMB) was obtained from obtained from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France), and used to prepare stock solutions of 20 mg/mL in sterile water.

Two clinical multi-drug resistant (MDR) strains of *Acinetobacter baumannii*, isolated from a patient before (AB121-D0) and 12 days after treatment with colistin (AB122-D12) from a patient who got an infection after heart surgery, were used during this study (31). PMB Minimum inhibitory concentrations (MICs) of both strains were verified in accordance with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations (32, 33), and confirmed at 1 µg/mL for the susceptible (AB121-D0) and 64 µg/mL for the resistant (AB122-D12).

3.2. Sequencing

AB121-D0 and AB122-D12 were sequenced in order to confirm their phenotypes and the assembled genome of AB122-D12 was used for RNA transcripts mapping in transcriptomic analysis.

From overnight bacterial liquid cultures, genomic DNA (gDNA) was extracted using QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Total extracted gDNA was repaired and end-prepped using NEBNext Companion Module for Oxford Nanopore Technologies (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), then quantified using a Nanodrop One (Thermofischer Scientific, Waltham, MA, USA). Native barcoding was processed using the Native Barcoding Expansion kit EXP-NBD114 (ONT, Oxford, UK). All samples were pooled at equimolar concentration to obtain a total of 1.5 µg barcoded DNA before ligation step. Ligation of adapters was performed with the Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 (ONT, Oxford, UK). Library was enriched for fragments longer than 3 kb by using the Long-Fragment Buffer during purification. Purification was carried out at each step using NucleoMag NGS Clean-up and Size Select magnetic beads (Macherey-Nagel, Düren,Germany). Long-read sequencing was performed during 24h using a MinION sequencer Mk1b (Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford, UK) and Minknow (22.03.6), ligation sequencing kit

SQK-LSK109 (ONT) and flow cell FLO-MIN106 R9.4.1 (ONT). Basecalling of raw data (FAST5 format) was performed real-time using guppy (ONT; v6.0.7) in High-Accurate mode. Filtlong (v0.2.1) was used to remove all fragments shorter than 1 000 base pairs (bp) (34). Genomes were assembled by using Trycycler pipeline (v0.5.3) (35) which combine the *de novo* assembler softwares (Flye (v2.9-b1769), Miniasm (v0.3-r179) + Minipolish (v0.1.3), Raven (v1.8.1) (36–38)). Then, assembled genomes were polished with medaka (ONT; v1.6.0) using defaults settings of the medaka_consensus program (one round of polishing) (39). Median coverage was 337 for AB121-D0 chromosome and 511 for its plasmid, and 497 & 927 respectively for AB122-D12. For both strains a total of 39.2% GC was evidenced for chromosome and 33.7% for plasmid. Gene prediction was performed with prokka (v1.14.6) pipeline (40) using *Acinetobacter baumannii* TCDC-AB0715 (GCA_000189735.2) transcript and protein datasets. Geneious prime software (v2022.1.1) was used to visualize results (Biomatters, Auckland, New Zealand). ResFinder was also used to assess bacteria resistome (41).

3.3. Bacterial samples preparation for transcriptomics

Bacteria were cultured overnight at 35° C ± 2°C under shaking (180rpm) in cation adjusted Mueller Hinton (CAMHB). From this culture diluted to 1/50, a new pre-culture was prepared and incubated until an optical density (OD) of 0.3 (corresponding to 1.10^8 CFU/mL of bacteria in exponential growth phase). Pre-culture was centrifuged and concentrated in order to get an inoculum at 5.10^9 CFU/mL. The bacterial pre-culture was then diluted to obtain a starting inoculum at 1.10^8 CFU/mL in TK flaks with 200mL of CAMHB. One PMB concentration per strain was chosen in order to observe CFU decrease followed by regrowth with enough bacterial material. Therefore TK experiments were done with PMB at either 1 mg/L for AB121-D0 or 32 mg/L for AB122-D12 and incubated at 35°C ± 2°C under shaking. Drug-free CAMHB flaks were used as a bacterial growth control for each strain. Bacteria were sampled over time at T0h, T1h, T2h, T4h, T6h and T24h, centrifuged and pellets were kept at -80°C in RNA later for RNA extraction. At each sampling time, bacteria were also serially diluted in NaCl 0.9%, and plated onto Mueller-Hinton agar. They were then counted after overnight incubation to follow bacterial growth. The limit of quantification was fixed to 400 CFU/mL (i.e. 2.6 log10 CFU/mL). Experiments were conducted in triplicate for both strains.

3.4. RNA extraction and RNA sequencing

RNA was extracted from bacterial pellet by using PureLink RNA Mini Kit (Ambion) and following manufacturer's instructions for "purification from bacterial cell". Briefly, bacteria were lysed with lysozyme solution (Lysozyme from chicken egg white, Sigma Aldrich), SDS (Sodium n-dodecyl sulfate (SDS), 20% aq. Soln, Alfa Aesar) and β-Mercaptoethanol (Thermo Fisher Scientific). RNA was isolated, washed and eluated with kit's solutions. DNAse treatment was performed with TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher). Concentrations and purity were assess with Qubit (Qubit™ RNA BR Assay Kit, Invitrogen) and RNA samples were stored -20°C.

Stable RNA was depleted from the bulk extracts using the Illumina Ribo-Zero Plus kit. Next, the library preparation was performed using the Illumina stranded TruSeq RNA library kit; cDNA synthesis and Library preparation using barcodes as well as equimolar pooling according to library quantification measurements. The libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq using an SP flow cell, with paired 50 cycle (2*50) with a total output of >650 Mio read pairs at Microsynth Ltd, Balgach, Switzerland.

3.5. RNA sequencing analysis

Illumina short reads were mapped to the AB122-D12 annotated from *Acinetobacter baumannii* TCDC-AB0715 (GCA_000189735.2) reference genome using Burrows-Wheeler Aligner (BWA; version 0.7.17); the resulting mapping files were processed with SAMtools (version 1.12). Per-feature read counts were performed using the Python module htseq-count (version 0.13.5) and Python (version 3.8.8). 3804 locus tag were initially identified. For identification purpose, locus-tag were referred as gene. Low counts were removed using filterByExpr from the EdgeR package (version 3.36.0) in R software (version 4.1.3). Raw RNA-Seq data was then normalized with DEGs analysis (DESeq2 package in R language – version 1.34.0) and Time + Treatment was used as design formula when strains were studied separately and Strain + Time + Treatment when they were combined. Variance stabilization transformation was applied and variance was use as threshold criteria to reduce noise and dataset size. Only genes showing a variance superior to 90% quantile were kept which decreased the dataset to 363 genes for AB121-D0, 368 for AB122-D12 and 370 when strains were combined. Gene expression profiles were analysed by using Weighted Gene Co-

expression Network Analysis (WGCNA package in R language – version 1.72-1). Pearson's correlations between each gene were calculated to build an adjacency matrix. The power parameters (β) were set to 6 when both strains were analysed together, 10 for AB121-D0 and 8 for AB122-D12 based on the scale-free topology criterion (42). For AB121-D0 & AB122-D12 combined and AB122-D12, as the lack of scale-free topology fit turned out to be caused by an interesting variable (the PMB treatment in this case), the appropriate soft-thresholding power was chosen in order to make the resulting networks conservative based on the number of samples according to recommendation. Co-expression networks were built using "signed hybrid" type for each analysis. The topological overlap measure (TOM) and corresponding dissimilarity (1-TOM) were calculated using adjacency matrix. (1-TOM) was used as a distance for gene hierarchical cluster, and then DynamicTree Cut algorithm (43) was used to identify the modules (defined as clusters of highly interconnected genes). Each module was assigned to a different number. Transcripts per million (TPM) were used to validated analysis results.

3.6. Confocal microscopy

For each strain, bacteria were cultured overnight under shaking (180rpm) at 35°C. Then these cultures were diluted to 1/50 in CAMHB, and incubated at 35°C under shaking (180rpm) until an optical density (OD) of 0.3 (corresponding to 1.10^8 CFU/mL of bacteria in exponential growth phase) was achieved. Bacterial cultures were centrifuged 10 minutes at 4400 rpm and pellets were re-suspended in CAMHB with SYTO 9 (Invitrogen) 2000-fold diluted, and incubated 30 minutes under shaking. Pellets were then washed twice with NaCl 0.9% and re-suspended in CAMHB in order to obtain bacterial cultures at 1.10^8 CFU/mL. PMB coupled with rhodamine B (Sigma-Aldrich) (PMB_R) was added at 2 mg/L for AB121-D0 and 4 mg/L AB122-D12. Tubes with PMB_R and without (growth control) were incubated under shaking between each sampling done 30min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h and 5h after PMB_R addition. Sytox Blue (Invitrogen) 2µL/mL was added 10 minutes before sample analysis. µ-Slide 8 wells (Ibidi) were used for sample visualisation on Olympus FluoView FV-3000 with confocal laser scanning microscope IX83 (zoom x100). Lasers were set as follow: Blue-405nm -> 430/470nm Power 1.61% HV 485 V Gain 1% Offset 3%; Green-488nm -> 500/540nm Power 0.54% HV 428V Gain 1% Offset 3% and Red-561nm -> 570/670nm Power 0.4% HV 399 V Gain 1% Offset 6%. The step was set at 0.57µm with a viewing window of 1024x1024 pixels - 0.124µm/pixel. Bacterial

samples were also taken at each time-point, serially diluted in NaCl 0.9% and plated onto CAMHB agar to quantify bacterial growth.

4. RESULTS

4.1. Strain characterization

Sequencing of AB121-D0 and AB122-D12 confirmed the MLST genotype of 281 published previously for both strains (31). Resfinder analysis validated also the resistome of both strains except for quinolones (*gyrA*) and sulphonamides (*sul1*). The nucleotides duplication reported in the publication for AB122-D12 was found in the gene annotated PFEDJJEH_00715 corresponding to a signal transduction histidine kinase (733 978 - 735 342 bp). The blast analysis of the sequence confirmed the modification of *pmrB* gene, absent in AB121-D0.

4.2. Time-kill

Time kill curve kinetics of the two strains treated with PMB (1 mg/L for AB121-D0 and 32mg/L for AB122-D12) showed a rapid initial killing resulting in a CFU decrease of 1 to 2-log compared to control. This initial phase was followed by regrowth, starting 1h after drug exposure (Figure 1). PMB-treated cultures reached bacterial densities comparable to untreated cultures after ~4h. AB122-D12 showed more variability between replicates compared to AB121-D0.

4.3. Transcriptomic analysis

4.3.1. Global expression trends

To gain a global overview of trends in gene expression, we first estimated the expression of each gene based on the sequencing read counts mapping to each locus. Thus quantified expression was used for Principal Component Analysis (PCA) to identify trends in expression profiles that could be indicative of biologically tractable changes.

For AB121-D0, replicates cluster with samples followed a clear trajectory in PCA plots (Figure 2). Principal component 1 (PC1), which captured 39% of the variance correlated with bacterial growth (including recovery) while PC2 which captured 35% of the variance correlated with treatment. It is important to note that biological replicates showed good clustering and supported a clear differentiation among.

For AB122-D12, PC1 captured 75% of the variance and correlated with bacterial growth. In contrast PC2, which correlated with treatment, captured only 11% of variance (Figure 2). Sample types of T0h and T1h without PMB were less clustered than AB121-D0, but one of the main differences between strains corresponded to T4h with PMB, for which the replicates were scattered and close to the T1h conditions with or without PMB.

The trends in gene expression observed following PCA analysis reflect those observed in the time kill kinetics. To build on this finding, we performed a co-expression analysis to identify key biological pathways and expression modules that correlate with the observed re-growth.

4.3.2. Modules analysis for AB121-D0

For analysis done with AB121-D0, by comparing the treated samples with PMB versus controls, five modules, meaning gene clusters, were identified with different gene expression profiles over time (Figure 3). Within this five modules, the two main showing the greatest differences between conditions with and without antibiotics will be detailed here. Complete genes list and their modules identification are available in supplemental material (Table S1). The percentages of decreased or increased genes expression were obtained after normalization of data on the gene expression value of experimental T0h.

In module 2 which correspond to genes treated with PMB showing a decrease of expression regarding the controls, 99 genes were allocated to it (Figure 3). 42 (42.4%) genes were associated to hypothetical proteins, 38 (38.4%) with diverse metabolisms, 4 (4%) with the fatty acids metabolism (for example: *accB* & *accC*), 4 (4%) were related to efflux systems (ex: *carO, ompA*), 8 (8%) involved in the stress response like *uspA* and 4 (4%) in the bacteria virulence such as *cinA*. The expressions of these genes in this module are averaging 18%, 41% and 11% decreased at T1h, T2h and T4h respectively compared to the controls.

In module 3 corresponding to genes showing an overexpression in samples with PMB compared to controls, 91 genes were identified with this expression profile (Figure 3). Its included 35 (38.5%) hypothetical proteins, 21 (23.1%) genes associated with diverse metabolisms, 7 (7.7%) with amino-acids metabolism especially regarding phenylalanine, 13 (14.3%) to efflux system involving *omp25*, *mlaD, baeS, macA* and *macB*, and 15 (16.5%) genes related to membrane integrity such as *lolA* and *lolB, bccA,* and *lpxL* (Figure 4). In this module, the highlighted pathway showed an increase gene expression approximately of 44%, 43% and 30% regarding T1h, T2h, and T4h of controls respectively.

4.3.3. Modules analysis for AB122-D12

Three modules were identified for AB122-D12 with different gene expression profiles (Figure 3). The module 2 corresponded, as for AB121-D0, to genes showing a decrease expression with antibiotic treatment. In this module, 253 genes were identified including 115 (45.5%) hypothetical proteins, 80 (32.6%) associated with diverse metabolisms, 13 (5%) with efflux systems such as *ompA* or ABC transporters, 10 (4%) with fatty acids metabolism, 10 (4%) with TCA circle or the metabolism of pyruvate/acetyl-coA (examples: *fumC* or *acnA*), 18 (7.1%) were involved in stress response such as *clpB* and 6 (2.4%) in virulence like *acfC* or *araC.* Moreover, 75% of genes associated to module 2 for AB121-D0 were also observed with a decreased expression for AB122-D12. The decrease expression in samples with PMB is equivalent to 17%, 45% and 37% at T1h, T2h, and T4h compared to controls.

In module 3, corresponding to gene presenting an overexpression when treated with PMB, 105 genes were identified (Figure 3). 11 (10.5%) genes were associated to hypothetical proteins, 21 (20%) with diverse metabolisms, 5 (4.8%) with the amino-acids metabolism, 10 (9.5%) were related to efflux systems, 8 (7.5%) involved in the oxidative phosphorylation pathway and 55 (52.4%) genes were involved in protein synthesis (Figure 4). The increase expression of this pathways corresponded in average to 16.1%, 16.3% and 9.8% in treated sample compare to T1h, T2h an dT4h of control.

4.4. Confocal microscopy

For AB121-D0, bacteria observation with confocal microscope showed no differences over time of the fixation of PMB-rhodamine to membranes either for living or dead bacteria (Figure 5).

For AB122-D12, bacterium formed more aggregates compared to AB121-D0. Results depicted also variations of PMB-rhodamine fixation to bacterial membranes with a mix of living bacteria fixing or not the compound on their membranes. This bacterial mix was observable all along the experiment time course, with no selection of a specific subpopulation with the antibiotic pressure (Figure 5).

5. FIGURES

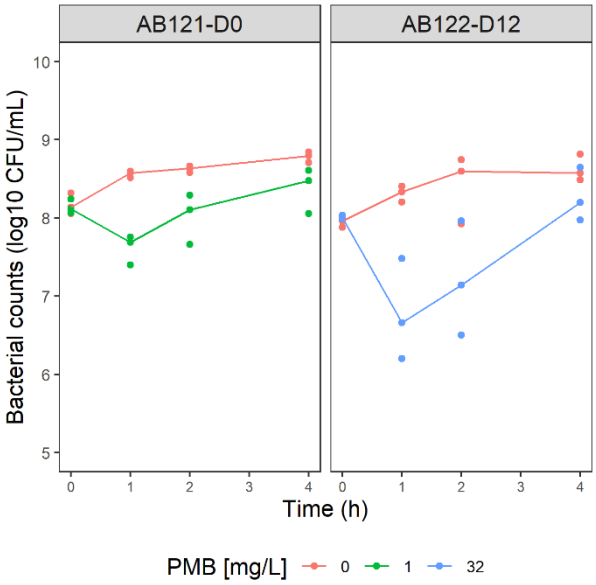
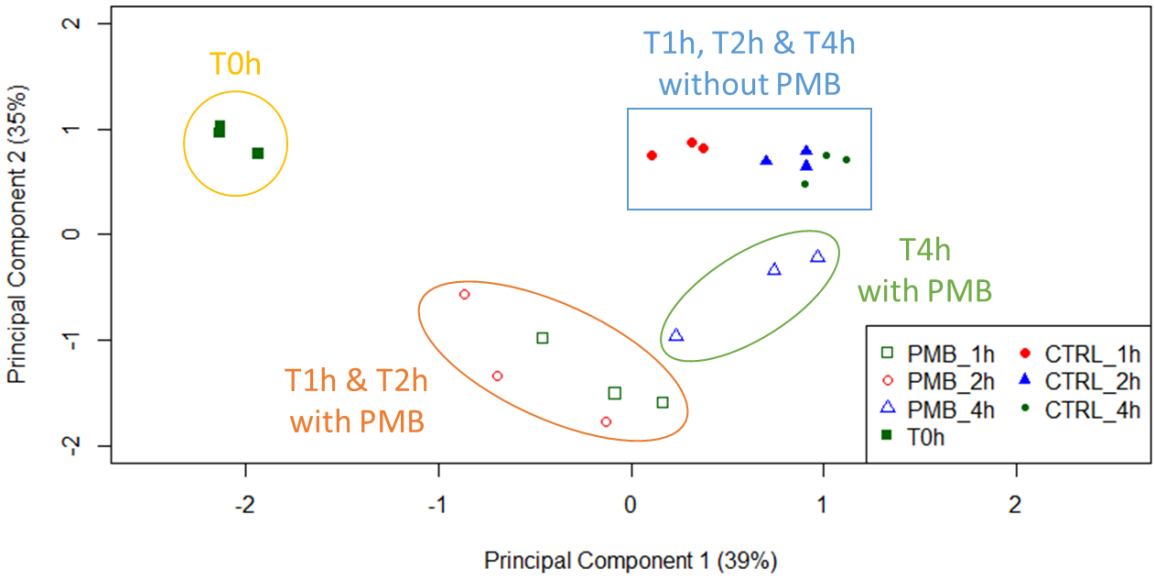


Figure 1: *Bacterial counts of transcriptomic samples. Line: median of triplicates*

AB121-D0



AB122-D12

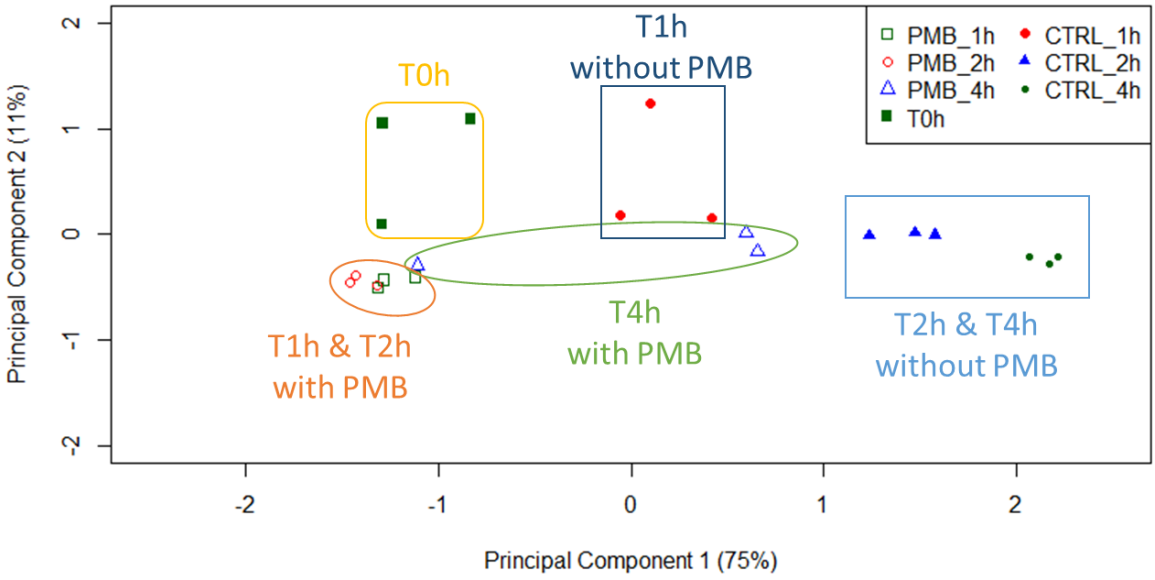
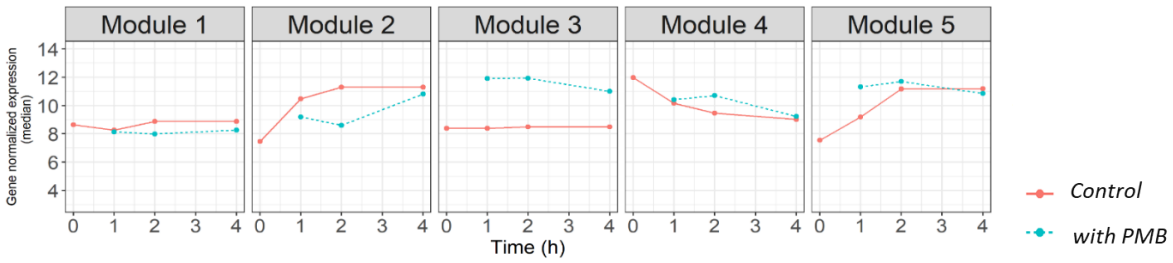


Figure 2: *Principal Component Analysis (PCA) for AB121-D0 and AB122-D12*

AB121-D0



AB122-D12

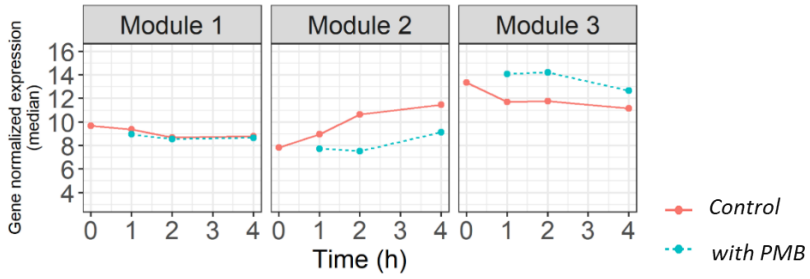
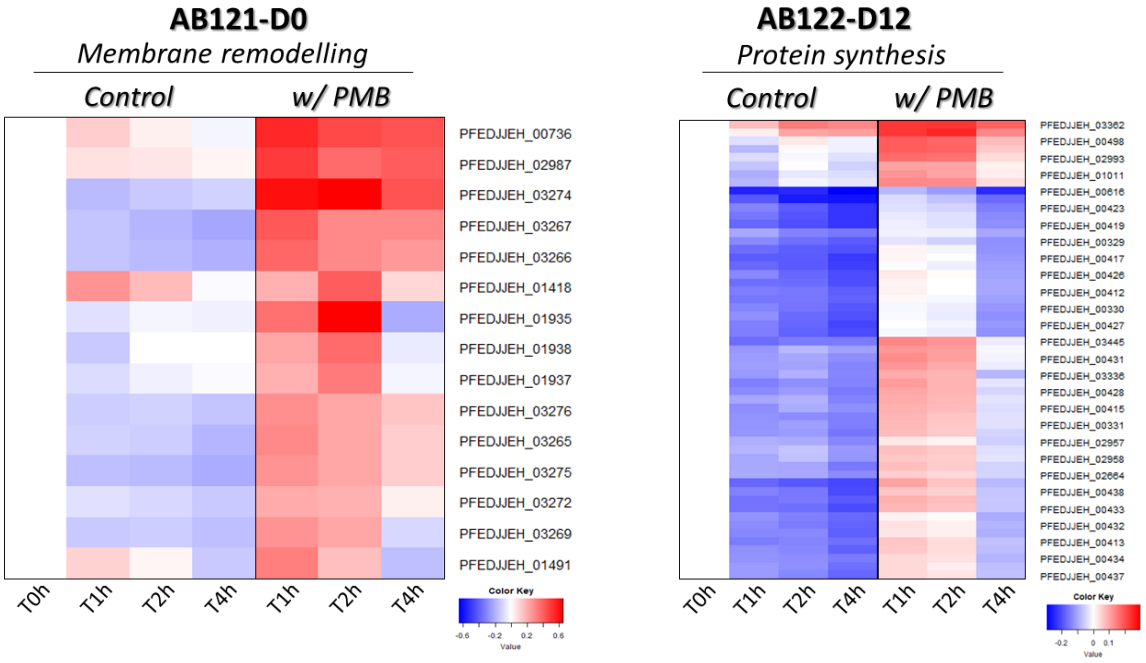


Figure 3: *Modules expression profiles. Lines depicted the median of gene expression. Red the data without PMB and in turquoise the data with. Dots have been connected for identification purpose.*

A. Main pathways highlighted with transcriptomic analysis



B. Known genes conferring resistance to PMB

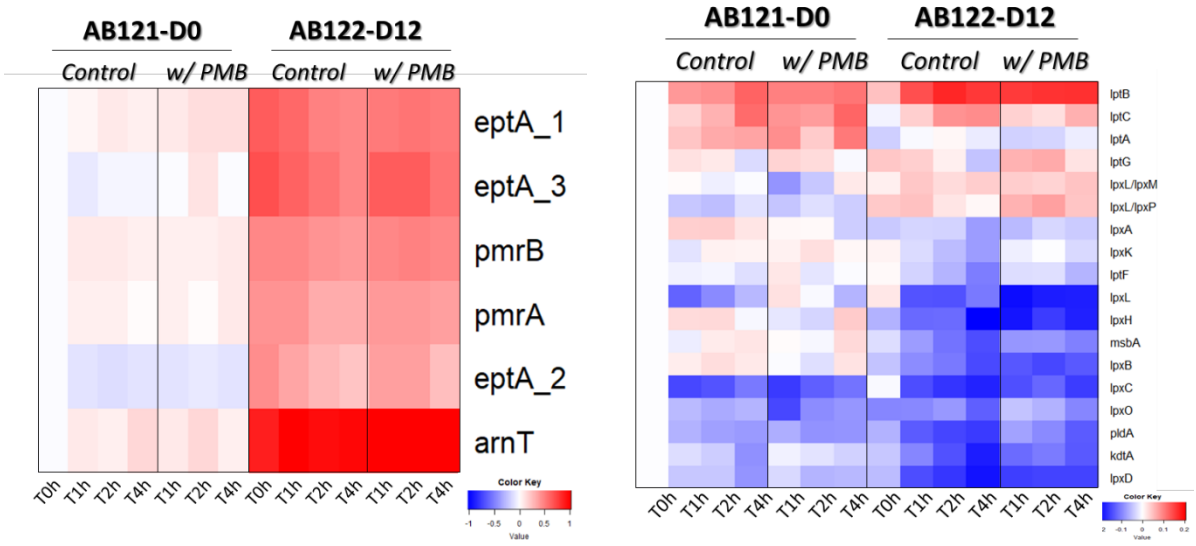


Figure 4: *Heatmaps of gene expressions. Data have been normalized on genes expression value at T0h. w/ PMB corresponded to condition with PMB and Control: without.*

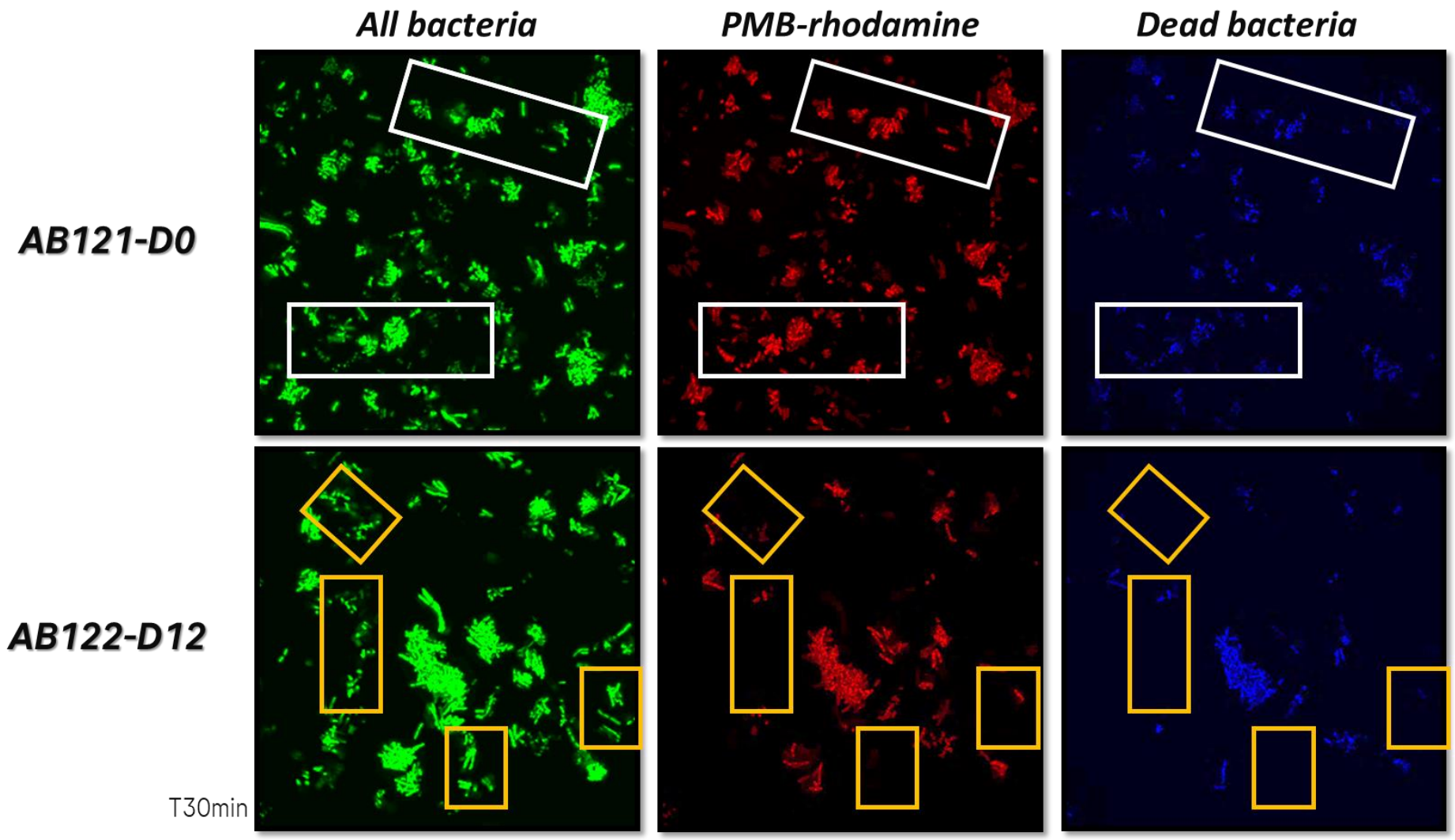


Figure 5: *Pictures obtained with confocal microscope. All bacteria are labelled in green with Syto 9, PMB-rhodamine is in red and dead bacteria are in blue labelled with Sytox Blue.*

6. DISCUSSION

Two clinical strains with different phenotypes regarding PMB were selected for this study. AB121-D0 was susceptible to the antibiotic, and AB122-D12 was resistant due to an insertion of 10 amino-acids in *pmrB*, known to confer polymyxins resistance. In TK experiments, both strains showed similar curve profiles for a concentration around their MIC (1xMIC for AB121-D0 and 0.5xMIC for AB122-D12), with an initial CFU decreased up to 1h of experiment followed by regrowth, reaching CFU control level after 4h. Data were reproducible between biological replicates of each strain (done from separated cultures) with less than 2-log CFU differences. Based on these data, this study aimed to identify adaptation mechanisms potentially responsible for bacterial regrowth observed during *in vitro* TK experiments with *A. baumannii* and PMB. Trends in global expression modulation were more discernible for AB121-D0 than AB122-D12 especially for samples with and without PMB, despite the strains showing similar TK curve profiles. These results suggested specific strain responses regarding PMB treatment. To better understand the mechanisms underlying the bacterial regrowth and how they are expressed, the transcriptomic analysis was done by analysis gene expression variations over time through modules identification, grouping genes with similar expression over time allowed in order to have a detailed characterisation of bacterial response.

Results first confirmed the quick appearance of bacterial response to PMB as observed previously (44, 45). This response which appeared mainly within the first 2h hours of drug exposition, corresponded also to the switch in TK experiment when CFU stop decreasing and bacteria start to regrowth, and therefore to the selection of bacteria population able to growth under PMB pressure. After 4h, the CFU of samples with PMB reached control CFU values, and transcriptomic response followed also this pattern.

Following PMB treatment, both strains showed a downregulation of genes involved in bacteria stress response and of genes involves in bacterial virulence over time. However, in contrast to what has been observed in literature (22, 44), for AB121-D0, an increase at T2h was observed for genes involved in pili formation. For AB122-D12 no specific genes regarding pili were highlighted in the analysis.

Concerning the mechanisms underpinning re-growth, AB121-D0 seemed to remodel its membrane as response to PMB exposure, which confirmed literature results (20, 44, 47, 48, 21, 22, 55). Indeed an increase expression was observed of *lolA* (PFEDJJEH_00736, PFEDJJEH_03266) and *lolB* (PFEDJJEH_02987) involved in the lipoproteins traffics at the membranes (58), *mlaD* (PFEDJJEH_00351) involved in the management of phospholipid at the membrane (59) or *baeS* (PFEDJJEH_00573) a

bacterial two-components system which detects environmental signals and responds by altering the bacterial envelope by upregulating efflux pump expression in response to specific envelope-damaging agents (60). Additionally, the overexpression of several genes such as the subunit of pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase (PFEDJJEH_01935, PFEDJJEH_01937, PFEDJJEH_01938), leads to an increase in the acetyl-CoA pool in cells. The acetyl-CoA participates in metabolism of many cell components such as proteins, carbohydrates or lipids. Its main function is to deliver the acetyl group to the citric acid cycle to be oxidized for energy production in the TCA cycle. However results of this study showed no significant changing expression of genes involved in TCA cycle, except for those involved in the conversion of citrate to isocitrate. Several genes involved either in the synthesis of fatty acids, in their regulation or transport or in β-oxidation showed an upregulation of their expressions compared to control within the first hours of experiment. Moreover, comparable to literature (36, 39, 50, 23), AB121-D0 harboured a decreased expression of genes involved in biotin synthesis *accB* and *accC* (PFEDJJEH_02336 and PFEDJJEH_02337) involved in the initial step of fatty acid biosynthesis. Taken together these results indicates an active metabolism/catabolism of membranes components and reinforce the assumption of bacterial membrane remodelling in response to PMB antimicrobial activity.

The resistant strain AB122-D12, carries a 10 amino acids insertion in *pmrB*, absent in AB121-D0, and previous studies have already investigated gene expression profiles *of A. baumannii* strains exhibiting mutation(s) in *pmrABC* operon (46, 49, 48), known to confer polymyxins resistance through constitutive eptA expression reducing the overall net-negative charge of the membrane by lipid A modification (64). However the bacteria samples used for these studies were sampled from cultures done without antibiotic and therefore, did not reflect the direct bacterial response of this type of *A. baumannii* isolates to PMB. Nevertheless, similarly to these studies, an increased expression of *pmrA*, *pmrB, eptA* and *arnT* (PFEDJJEH_00714 PFEDJJEH_00715, PFEDJJEH_00713 PFEDJJEH_01239, PFEDJJEH_02341, and PFEDJJEH_00844) was observed for AB122-D12, as well as *DAGK* (diacylglycerol kinase PFEDJJEH_00806) (Figure 2). *DAGK* is an integral membrane lipid kinase converting diacylglycerol to phosphatidic acid, and participates in recycling diacylglycerol during the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides and lipopolysaccharides (65). It plays an important role in response to environmental stress, such as low osmolality, and therefore participates in maintaining membrane integrity. These genes showed an increased expression compared to AB121-D0, but no variation of expression was observed with PMB treatment compared to control data. For AB122-D12, the main pathway overexpressed with PMB treatment was the protein synthesis (more than 50% of genes expressed in module 3). Many genes involved in the different ribosomal subunits 50S or 30S, with genes involved in the synthesis of tRNA (*trmD* PFEDJJEH_00330) with the pre-protein translocase

subunit *SecY* (PFEDJJEH_00432) and *rpoA* (DNA-directed RNA polymerase subunit alpha PFEDJJEH_00437) were overexpressed, and considering the increased pool of ATP in the cells, it indicates a particularly active metabolic state of the strain. However the direct link between the bacteria response to PMB treatment which might explain the survival of the bacteria in TK experiments was not obvious.

After the lipid A modification, the second main mechanism of resistance regarding PMB is the lipooligosaccharides (LOS) loss at bacterial membrane but, in this transcriptomic study, both strains did not seem to use this mechanism to growth under PMB pressure. For AB121-D0, the increased expression of transglycosylase SLT observed (PFEDJJEH_00815) has been previously shown to be associated with the development of colistin dependence in LOS deficient *A. baumannii* (62). However no significant change in *pldA* or *lpx* genes has been observed with PMB exposure in this study (Figure 4), and which would had indicated a potential loss of LOS, including no changing in *lpxO*, responsible of hydroxylation laurate fatty acid chain transferred by *LpxL* and which contributes to PMB resistance (63). Moreover, the absence of modification of PMB membrane receptor was confirmed with confocal microscopy results, where no changes of PMB-rhodamine fixation was observed on bacterial membranes all along TK experiment course (Figure 5). Furthermore, unlike what is observed in literature (44, 46–49, 22), no significant changes were observed for both AB121-D0 & AB122-D12, regarding *pgaA* and *pgaB* genes expression, which are involved in the transport of polysaccharides and potentially associated with polymyxin resistance for strains harbouring LPS/LOS deficiency (50).

For AB122-D12, as no changes with PMB treatment in the expression of genes known to be involved in PMB resistance were observed and in association with the increased expression of protein synthesis; a hypothesis for the regrowth of bacteria in TK experiments would be an increase in synthesis of the phosphoethanolamine protein, which would add more positive charges on lipid A and prevent the attachment of PMB to the membrane. To test this hypothesis, confocal microscopy experiments with labelled PMB were carried out to follow the binding of PMB to the membranes. Results showed since the beginning of the experiment, that AB122-D12 displayed different bacteria subpopulations regarding PMB fixation to the membranes. These subpopulations were not preferentially selected during TK experiments time course. Thus, all together these results suggest that the potential resistance mechanism of AB122-D12 would be a combination between hetero-resistance and the triggering of adaptation mechanisms which still remains to be identified.

For both AB121-D0 and AB122-D12, an increased expression of genes involved in transmembrane transporters was observed. For example for AB121-D0, *omp25* (porin PFEDJJEH_00167), with *macA* and *macB* (family efflux pump subunit PFEDJJEH_03247 & PFEDJJEH_03248) were highly expressed

compared to control since T1h, and for AB122-D12: *adeA* to *adeC* (multidrug efflux RND transporter outer membrane channel PFEDJJEH_02029 to PFEDJJEH_02031). Efflux systems, often associated with antibiotic resistance especially for carbapenems (51–53), are recurrently overexpressed in transcriptomics studies done with *A. baumannii* and polymyxins (20, 44, 46, 48, 47, 54, 21, 22, 55). If some studies have shown that these systems participate to the strains sensitivity to polymyxins (56, 57), it might also be a first intention protection mechanism that strains triggered when exogenous molecules are detected. Indeed, to be effluxed PMB molecules had to be already into the cell and according to PMB mode of action, entrance of PMB molecules into cells would indicates already membrane damages, therefore further studies are warranted to better understand the direct role of efflux system into PMB resistance.

Transcriptomic analysis allows to characterize the full bacterial response regarding genes expression for a given condition. However the analysis outcomes are dependant of experimental data, and if for AB121-D0, a clear separation was observed between the different types of samples (Figure 2), for AB122-D12, there was reduced distinction for treated versus non treated samples especially regarding T4h, which may explain the difficulties encountered in the scale-free topology step which led to the manual setting of the criteria. If the genes expression per modules has been verified with genes TPM expression, which corroborated this study outcomes, more replicates for AB122-D12 would have probably improved the analysis. Moreover, results are also dependent on how the analysis is performed. Here, variance was used as threshold criteria which selected only genes showing the most important gene changing expression overtime. Therefore, the obtained results were conditioned to this selection and possible other outcomes regarding PMB resistance may have been missed. Moreover, considered all modules combined, more than 34% of selected genes (~34% for AB121-D0 and 39% for AB122-D12) were identified as hypothetical protein which leave the possibility of potential unknown resistance mechanism regarding PMB antimicrobial activity. Regarding the outcomes of this analysis, the potential resistance mechanisms identified need to be further investigated with other omics methods such as proteomics or metabolomics. Indeed, the genome and genes expression are just a part of the cells metabolism and do not systematically translate into changes in proteomics or metabolomics as previously shown (66). Individual omic approaches found their interests in the screening process for a specified condition but differentiation between correlation and causation requires often additional evidences. Therefore to fully understand resistance mechanisms allowing the bacteria to growth under antibiotic pressure, the whole picture has to be taken into account.

This study was carried out with the aim to inform PK/PD models on *A. baumannii* resistance mechanisms regarding PMB. However, the results obtained in this study do not allow to directly

integrate transcriptomic results into the models as hypothesis regarding resistance mechanisms have first to be verified but also, because several pathways were highlighted and the hierarchical relationship between pathways (for example membrane remodelling vs efflux system for AB121-D0) remains challenging. Furthermore, the genes highlighted in this analysis are involved in metabolic pathways but never all the genes of a designated pathway showed a changed expression, which means that the results interpretation must be cautious. Nevertheless, transcriptomic studies may inform on the PD models structure, indeed for AB121-D0 the use of a model with adaptation should be preferred compared to hetero-resistance with different subpopulations, whereas for AB122-D12 the use of a model combining hetero-resistance and adaptation should be encouraged. The present research study is part of the efforts of a continuous improvement of PK/PD modelling to more mechanistic models in order to better characterize biological phenomenon and to be able to extrapolate *in vitro* or *in vivo* observations to broader situations in order to *in fine* better predict dosing regime and outcome in patients.

ACKNOWLEDGMENT

The confocal microscopy observations were made using the “ImageUp” service at the University of Poitiers.

FUNDING

Mathilde Lacroix received a CIFRE fellowship founded in part by National Association for Research and Technology (ANRT), on the behalf of the French Ministry of Higher Education and Research, and in part by Institut Roche

7. REFERENCES

1. ICPD-White-Paper-De-risking-Drug-Development-with-PK-PD.pdf.
2. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol Rev 65:1053–1090.
3. Tam VH, Schilling AN, Nikolaou M. 2005. Modelling time-kill studies to discern the pharmacodynamics of meropenem. J Antimicrob Chemother 55:699–706.
4. Kulengowski B, Campion JJ, Feola DJ, Burgess DS. 2017. Effect of the meropenem MIC on the killing activity of meropenem and polymyxin B in combination against KPC-producing Klebsiella pneumoniae. 9. J Antibiot 70:974–978.
5. Wang F, Zhou Q, Yang X, Bai Y, Cui J. 2021. Evaluation of ceftazidime/avibactam alone and in combination with amikacin, colistin and tigecycline against Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae by in vitro time-kill experiment. PLOS ONE 16:e0258426.
6. Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. 1997. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 41:733–738.
7. Meagher AK, Forrest A, Dalhoff A, Stass H, Schentag JJ. 2004. Novel pharmacokinetic-pharmacodynamic model for prediction of outcomes with an extended-release formulation of ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 48:2061–2068.
8. Schuck EL, Dalhoff A, Stass H, Derendorf H. 2005. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) evaluation of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. Infection 33 Suppl 2:22–28.
9. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2012. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants. Antimicrob Agents Chemother 56:179–188.
10. Jacobs M, Grégoire N, Couet W, Bulitta JB. 2016. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. PLOS Computational Biology 12:e1004782.
11. Chauzy A, Ih H, Jacobs M, Marchand S, Grégoire N, Couet W, Buyck JM. 2020. Sequential Time-Kill, a Simple Experimental Trick To Discriminate between Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Models with Distinct Heterogeneous Subpopulations versus Homogenous Population with Adaptive Resistance. Antimicrob Agents Chemother 64:e00788-20.
12. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, Zheng Y, Guo Y, Zhang R, Hu F, China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. 2020. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10.
13. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? | Open Forum Infectious Diseases | Oxford Academic. https://academic.oup.com/ofid/article/6/10/ofz368/5550895. Retrieved 24 March 2023.

14. Acheampong G, Owusu M, Owusu-Ofori A, Osei I, Sarpong N, Sylverken A, Kung H-J, Cho S-T, Kuo C-H, Park SE, Marks F, Adu-Sarkodie Y, Owusu-Dabo E. 2019. Chromosomal and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in human Salmonella enterica infection in Ghana. BMC Infectious Diseases 19:898.

15. Reygaert WC. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol 4:482–501.

16. Fernández L, Hancock REW. 2012. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews 25:661–681.

17. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P. 2003. MexXY-OprM Efflux Pump Is Necessary for Adaptive Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 47:1371–1375.

18. Ni RT, Onishi M, Mizusawa M, Kitagawa R, Kishino T, Matsubara F, Tsuchiya T, Kuroda T, Ogawa W. 2020. The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of Klebsiella pneumoniae. 1. Sci Rep 10:10876.

19. Pacios O, Fernández-García L, Bleriot I, Blasco L, Ambroa A, López M, Ortiz-Cartagena C, González de Aledo M, Fernández-Cuenca F, Oteo-Iglesias J, Pascual Á, Martínez-Martínez L, Tomás M. 2022. Adaptation of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae to the combination of niclosamide with the efflux pump inhibitor phenyl-arginine-β-naphthylamide (PaβN): co-resistance to antimicrobials. J Antimicrob Chemother 77:1272–1281.

20. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, Nation RL, Li J, Harper M, Adler B, Boyce JD. 2012. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-β-1,6-N-acetylglucosamine. Antimicrob Agents Chemother 56:59–69.

21. Boinett CJ, Cain AK, Hawkey J, Do Hoang NT, Khanh NNT, Thanh DP, Dordel J, Campbell JI, Lan NPH, Mayho M, Langridge GC, Hadfield J, Chau NVV, Thwaites GE, Parkhill J, Thomson NR, Holt KE, Baker S. 2019. Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in Acinetobacter baumannii. Microb Genom 5:e000246.

22. Li M. 2020. Pan-transcriptomic analysis identified common differentially expressed genes of Acinetobacter baumannii in response to polymyxin treatments.

23. Santajit S, Indrawattana N. 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int 2016:2475067.

24. Loyola-Cruz MÁ, Durán-Manuel EM, Cruz-Cruz C, Márquez-Valdelamar LM, Bravata-Alcántara JC, Cortés-Ortíz IA, Cureño-Díaz MA, Ibáñez-Cervantes G, Fernández-Sánchez V, Castro-Escarpulli G, Bello-López JM. 2022. ESKAPE bacteria characterization reveals the presence of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa outbreaks in COVID-19/VAP patients. Am J Infect Control https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.08.012.

25. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. 2014. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. Pathogens and Disease 71:292–301.

26. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed. Retrieved 7 February 2023.

27. Mohapatra SS, Dwibedy SK, Padhy I. 2021. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. J Biosci 46:85.

28. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 40:1333–1341.

29. Falagas ME, Michalopoulos A. 2006. Polymyxins: old antibiotics are back. The Lancet 367:633–634.

30. Critically important antimicrobials for human medicine : 6th revision. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241515528. Retrieved 24 March 2023.

31. Jaidane N, Naas T, Mansour W, Radhia BB, Jerbi S, Boujaafar N, Bouallegue O, Bonnin RA. 2018. Genomic analysis of in vivo acquired resistance to colistin and rifampicin in Acinetobacter baumannii. International Journal of Antimicrobial Agents 51:266–269.

32. EUCAST_SOP_10.2_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20211202.pdf.

33. CLSI M45 3rd Edition Medical Standard. https://fda.report/Standards/38133. Retrieved 6 February 2023.

34. Wick R. 2023. rrwick/Filtlong. C++.

35. Wick RR, Judd LM, Cerdeira LT, Hawkey J, Méric G, Vezina B, Wyres KL, Holt KE. 2021. Trycycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes. Genome Biology 22:266.

36. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. 5. Nat Biotechnol 37:540–546.

37. Wick RR, Holt KE. 2019. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing. F1000Res 8:2138.

38. Vaser R, Šikić M. 2021. Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. 5. Nat Comput Sci 1:332–336.

39. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. 2021. A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex. Nat Commun 12:4188.

40. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068–2069.

41. Florensa AF, Kaas RS, Clausen PTLC, Aytan-Aktug D, Aarestrup FM. 2022. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. Microb Genom 8:000748.

42. Zhang B, Horvath S. 2005. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. Stat Appl Genet Mol Biol 4:Article17.

43. Langfelder P, Horvath S. 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics 9:559.

44. Henry R, Crane B, Powell D, Deveson Lucas D, Li Z, Aranda J, Harrison P, Nation RL, Adler B, Harper M, Boyce JD, Li J. 2015. The transcriptomic response of *Acinetobacter baumannii* to colistin and doripenem alone and in combination in an *in vitro* pharmacokinetics/pharmacodynamics model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70:1303–1313.

45. Abdul Rahim N, Cheah S-E, Johnson MD, Zhu Y, Yu HH, Sidjabat HE, Butler MS, Cooper MA, Fu J, Paterson DL, Nation RL, Boyce JD, Bergen PJ, Velkov T, Li J. 2020. Transcriptomic responses of a New Delhi metallo-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolate to the combination of polymyxin B and chloramphenicol. International Journal of Antimicrobial Agents 56:106061.

46. Park YK, Lee J-Y, Ko KS. 2015. Transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identifies genes associated with colistin resistance in Acinetobacter baumannii. Clinical Microbiology and Infection 21:765.e1-765.e7.

47. Boll JM, Crofts AA, Peters K, Cattoir V, Vollmer W, Davies BW, Trent MS. 2016. A penicillin-binding protein inhibits selection of colistin-resistant, lipooligosaccharide-deficient Acinetobacter baumannii. Proc Natl Acad Sci U S A 113:E6228–E6237.

48. Cheah S-E, Johnson MD, Zhu Y, Tsuji BT, Forrest A, Bulitta JB, Boyce JD, Nation RL, Li J. 2016. Polymyxin Resistance in Acinetobacter baumannii: Genetic Mutations and Transcriptomic Changes in Response to Clinically Relevant Dosage Regimens. Sci Rep 6:26233.

49. Maifiah MHM, Cheah S-E, Johnson MD, Han M-L, Boyce JD, Thamlikitkul V, Forrest A, Kaye KS, Hertzog P, Purcell AW, Song J, Velkov T, Creek DJ, Li J. 2016. Global metabolic analyses identify key differences in metabolite levels between polymyxin-susceptible and polymyxin-resistant Acinetobacter baumannii. Sci Rep 6:22287.

50. Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. 2009. The pgaABCD locus of Acinetobacter baumannii encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. J Bacteriol 191:5953–5963.

51. Greene NP, Kaplan E, Crow A, Koronakis V. 2018. Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective. Frontiers in Microbiology 9.

52. Zhang Y, Li Z, He X, Ding F, Wu W, Luo Y, Fan B, Cao H. 2018. Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in Acinetobacter baumannii. Infect Drug Resist 11:457–467.

53. Terkuran M, Erginkaya Z, Konuray G, Meral M, Ünal N, Yaşar S, Köksal F. 2022. Evaluation of Antibiotic Resistance and adeABC, adeR, adeS Efflux Pump Genes among Foodborne and Clinical Acinetobacter spp. in Türkiye. Iran J Public Health 51:2753–2763.

54. Hua X, Liu L, Fang Y, Shi Q, Li X, Chen Q, Shi K, Jiang Y, Zhou H, Yu Y. 2017. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii MDR-ZJ06 Revealed by a Multiomics Approach. Front Cell Infect Microbiol 7:45.

55. Chamoun S, Welander J, Martis-Thiele M-M, Ntzouni M, Claesson C, Vikström E, Turkina MV. 2021. Colistin Dependence in Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii Strain Is Associated with ISAjo2 and ISAba13 Insertions and Multiple Cellular Responses. Int J Mol Sci 22:576.

56. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. 2008. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in Pseudomonas aeruginosa biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. Molecular Microbiology 68:223–240.

57. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. 2010. Klebsiella pneumoniae AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:177–183.

58. Kaplan E, Greene NP, Jepson AE, Koronakis V. 2022. Structural basis of lipoprotein recognition by the bacterial Lol trafficking chaperone LolA. Proceedings of the National Academy of Sciences 119:e2208662119.

59. Dutta A, Chandravanshi M, Kanaujia SP. 2021. Conserved features of the MlaD domain aid the trafficking of hydrophobic molecules. Proteins 89:1473–1488.

60. Leblanc SKD, Oates CW, Raivio TL. 2011. Characterization of the Induction and Cellular Role of the BaeSR Two-Component Envelope Stress Response of Escherichia coli. Journal of Bacteriology 193:3367–3375.

61. Chodisetti PK, Reddy M. 2019. Peptidoglycan hydrolase of an unusual cross-link cleavage specificity contributes to bacterial cell wall synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 116:7825–7830.

62. Lee J-Y, Lee H, Park M, Cha C-J, Shin D, Ko KS. 2019. Lytic transglycosylase contributes to the survival of lipooligosaccharide-deficient, colistin-dependent Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect 25:1156.e1-1156.e7.

63. Bartholomew TL, Kidd TJ, Sá Pessoa J, Conde Álvarez R, Bengoechea JA. 2019. 2-Hydroxylation of Acinetobacter baumannii Lipid A Contributes to Virulence. Infect Immun 87:e00066-19.

64. Janssen AB, Schaik W van. 2021. Harder, better, faster, stronger: Colistin resistance mechanisms in Escherichia coli. PLOS Genetics 17:e1009262.

65. Möbius K, Kazemi S, Güntert P, Jakob A, Heckel A, Becker-Baldus J, Glaubitz C. 2019. Global response of diacylglycerol kinase towards substrate binding observed by 2D and 3D MAS NMR. 1. Sci Rep 9:3995.

66. Zhu Y, Zhao J, Maifiah MHM, Velkov T, Schreiber F, Li J. 2019. Metabolic Responses to Polymyxin Treatment in Acinetobacter baumannii ATCC 19606: Integrating Transcriptomics and Metabolomics with Genome-Scale Metabolic Modeling. mSystems 4:e00157-18.

8. SUPPLEMENTAL MATERIAL

***Table S1**: Locus-tags and their corresponding products per module, identified by the WGCNA analysis for AB121-D0 and AB122-D12*

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_00040	1	1191		MFS family transporter	MFS transporter
PFEDJJEH_00041	1	804	alrA	2,5-diketo-D-gluconate reductase B	2,5-didehydrogluconate reductase DkgB
PFEDJJEH_00115	1	3315	vgrG	hypothetical protein	type VI secretion system tip protein VgrG
PFEDJJEH_00264	1	891		dehydrogenase	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
PFEDJJEH_01051	1	189		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01117	1	2097	basB	non-ribosomal peptide synthetase module	acinetobactin biosynthesis protein
PFEDJJEH_01130	1	870	basF	isochorismate hydrolase	acinetobactin biosynthesis bifunctional isochorismatase/aryl carrier protein BasF
PFEDJJEH_01131	1	1152	basG	histidine decarboxylase	acinetobactin biosynthesis histidine decarboxylase BasG
PFEDJJEH_01415	1	765	pxpA	LamB/YcsF family protein	5-oxoprolinase subunit PxpA
PFEDJJEH_01416	1	807		Putative hydro-lyase	putative hydro-lyase
PFEDJJEH_01486	1	939	paaA	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaA	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA
PFEDJJEH_02023	1	1374	puuB	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase	FAD-binding oxidoreductase
PFEDJJEH_02025	1	1248		saccharopine dehydrogenase	saccharopine dehydrogenase NADP-binding domain-containing protein
PFEDJJEH_02026	1	1308		monoamine oxidase	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase
PFEDJJEH_02563	1	327		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03241	1	492	ilvN	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	acetolactate synthase small subunit
PFEDJJEH_03603	1	207		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03604	1	2115		outer membrane receptor protein, mostly Fe transport	TonB-dependent copper receptor
PFEDJJEH_03605	1	429		hypothetical protein	DUF2946 family protein
PFEDJJEH_03863	1	498		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03864	1	411		hypothetical protein	type I restriction-modification system subunit M
PFEDJJEH_03889	1	759		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00052	2	159		hypothetical protein	DUF1328 domain-containing protein
PFEDJJEH_00215	2	855		putative methyltransferase	Methyltransferase
PFEDJJEH_00219	2	1245		MFS family transporter	MFS transporter
PFEDJJEH_00267	2	381		hypothetical protein	SEL1-like repeat protein
PFEDJJEH_00336	2	444		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00366	2	432		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00443	2	102		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00449	2	2055		Zn-dependent oligopeptidase	M3 family metallopeptidase

AB121-D0					
Locus TAG	Module	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_00454	2	594		phosphoserine phosphatase	HAD-IB family hydrolase
PFEDJJEH_00474	2	246		hypothetical protein	DUF2789 family protein
PFEDJJEH_00611	2	444		hypothetical protein	VOC family protein
PFEDJJEH_00648	2	141		hypothetical protein	entericidin A/B family lipoprotein
PFEDJJEH_00717	2	1188		putative ammonium transporter	ammonium transporter
PFEDJJEH_00768	2	6906		putative surface adhesion protein	Ig-like domain repeat protein
PFEDJJEH_00808	2	1143		glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	glycerophosphodiester phosphodiesterase
PFEDJJEH_00899	2	744	carO	putative porin protein associated with imipenem resistance	ornithine uptake porin CarO type 2
PFEDJJEH_00931	2	2022	uvrB	excinuclease ABC subunit B	excinuclease ABC subunit UvrB
PFEDJJEH_00948	2	1251		glycosyltransferase	glycosyltransferase family 2 protein
PFEDJJEH_00949	2	897		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00959	2	492		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01060	2	1200		hypothetical protein	DUF2213 domain-containing protein
PFEDJJEH_01061	2	471		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01063	2	384		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01064	2	384		hypothetical protein	DUF4054 domain-containing protein
PFEDJJEH_01067	2	444		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01068	2	768		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01079	2	390		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01299	2	228		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01318	2	2580	clpB	ATPase with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent chaperone ClpB
PFEDJJEH_01325	2	1416		outer membrane protein	OmpA family protein
PFEDJJEH_01331	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01351	2	357		ferredoxin	four-helix bundle copper-binding protein
PFEDJJEH_01352	2	330		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01368	2	459		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01369	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01370	2	1107		phage putative head morphogenesis protein, SPP1 gp7	minor capsid protein
PFEDJJEH_01375	2	594		hypothetical protein	DUF4142 domain-containing protein
PFEDJJEH_01376	2	630		putative surface antigen	hypothetical protein
PFEDJJEH_01401	2	438		hypothetical protein	DUF2147 domain-containing protein
PFEDJJEH_01405	2	459		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01426	2	1164		threonine dehydrogenase	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_01471	2	435		putative hemolysin	I78 family peptidase inhibitor
PFEDJJEH_01472	2	99		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01550	2	3483		indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	No significant similarity found
PFEDJJEH_01565	2	144		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01566	2	429		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01567	2	222		hypothetical protein	hypothetical protein

AB121-D0					
Locus TAG	Module	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_01568	2	318		putative 17 kDa surface antigen	surface antigen protein 1
PFEDJJEH_01569	2	222		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01570	2	480	cinA_2	putative competence-damaged protein	CinA family protein
PFEDJJEH_01571	2	1410		hypothetical protein	iron-containing redox enzyme family protein
PFEDJJEH_01572	2	2139		catalase	catalase HPII
PFEDJJEH_01573	2	879		dehydrogenase	SDR family oxidoreductase
PFEDJJEH_01574	2	414		hypothetical protein	DUF6367 family protein
PFEDJJEH_01575	2	1173		hypothetical protein	KGG domain-containing protein
PFEDJJEH_01578	2	612		putative threonine efflux protein	LysE family translocator
PFEDJJEH_01642	2	561		chromate transporter	chromate transporter
PFEDJJEH_01643	2	522		chromate transporter	chromate transporter
PFEDJJEH_01651	2	1308		Na+/H+-dicarboxylate symporter	dicarboxylate/amino acid:cation symporter
PFEDJJEH_01688	2	99		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01692	2	465		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01693	2	930		DMT family permease	DMT family permease
PFEDJJEH_01910	2	201		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01920	2	267		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01943	2	696		Zn-dependent hydrolase, including glyoxylase	MBL fold metallo-hydrolase
PFEDJJEH_01944	2	1656		putative NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	TIGR01244 family sulfur transferase
PFEDJJEH_01964	2	1419		aspartate ammonia-lyase	aspartate ammonia-lyase
PFEDJJEH_02006	2	177		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02007	2	237		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02010	2	468		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02011	2	366		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02013	2	1872		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02126	2	693		putative intracellular protease/amidase	type 1 glutamine amidotransferase domain-containing protein
PFEDJJEH_02138	2	831		alpha/beta superfamily hydrolase/acyltransferase	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_02248	2	360		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02272	2	639		hypothetical protein	SOS response-associated peptidase family protein
PFEDJJEH_02307	2	1245	dadA	D-amino acid dehydrogenase small subunit	D-amino acid dehydrogenase
PFEDJJEH_02310	2	297		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02312	2	1008	galE	UDP-glucose 4-epimerase	UDP-glucose 4-epimerase GalE
PFEDJJEH_02336	2	420	accB	biotin carboxyl carrier protein	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
PFEDJJEH_02337	2	1371	accC	biotin carboxylase	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl subunit
PFEDJJEH_02404	2	444		universal stress protein UspA	universal stress protein
PFEDJJEH_02406	2	426	pliG	Inhibitor of g-type lysozyme	DNA breaking-rejoining protein
PFEDJJEH_02407	2	132		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02413	2	471		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02455	2	219		hypothetical protein	hypothetical protein

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_02514	2	597		hypothetical protein	alpha-E domain-containing protein
PFEDJJEH_02515	2	1551		putative protein	circularly permuted type 2 ATP-grasp protein
PFEDJJEH_02518	2	231		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02528	2	204		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02540	2	1686	aspT	permease	aspartate-alanine antiporter
PFEDJJEH_02541	2	1053		aspartate aminotransferase	bifunctional aspartate transaminase/aspartate 4-decarboxylase
PFEDJJEH_02547	2	1488	proP	proline/glycine betaine transporter	glycine betaine/L-proline transporter ProP
PFEDJJEH_02565	2	363		putative protein	NirD/YgiW/YdeI family stress tolerance protein
PFEDJJEH_02566	2	645		glycosyltransferase	glycosyltransferase
PFEDJJEH_02567	2	600		SAM-dependent methyltransferase	class I SAM-dependent methyltransferase
PFEDJJEH_02568	2	795		LmbE protein	PIG-L family deacetylase
PFEDJJEH_02569	2	990		putative acyl-CoA dehydrogenase-related protein	acyl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_02570	2	234		hypothetical protein	DUF2171 domain-containing protein
PFEDJJEH_02633	2	1371	yegQ	putative protease	tRNA 5-hydroxyuridine modification protein YegQ
PFEDJJEH_02743	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02799	2	876	ureD	urease accessory protein	urease accessory protein UreD
PFEDJJEH_02801	2	480	nlpE	putative lipoprotein NlpE involved in copper resistance	copper resistance protein NlpE
PFEDJJEH_02802	2	1605		isocitrate lyase	isocitrate lyase
PFEDJJEH_02845	2	1146		galactose mutarotase	galactose mutarotase
PFEDJJEH_02877	2	201		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02933	2	1419		phosphomannomutase	phosphomannomutase/phosphoglucomutase
PFEDJJEH_03001	2	474	lysM	LysM domain/BON superfamily protein	peptidoglycan-binding protein LysM
PFEDJJEH_03017	2	852		trehalose-6-phosphatase	trehalose-6-phosphatase
PFEDJJEH_03018	2	1431		trehalose-6-phosphate synthase	trehalose-6-phosphate synthase
PFEDJJEH_03041	2	501		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03051	2	1677		hypothetical protein	mechanosensitive ion channel
PFEDJJEH_03052	2	228		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03095	2	2925		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03121	2	1020	add	adenosine deaminase	adenosine deaminase
PFEDJJEH_03159	2	339	raiA	ribosome-associated protein Y (PSrp-1)	ribosome-associated translation inhibitor RaiA
PFEDJJEH_03220	2	1455		NAD/NADP transhydrogenase beta subunit	NAD(P)(+) transhydrogenase (Re/Si-specific) subunit beta
PFEDJJEH_03221	2	315		pyridine nucleotide transhydrogenase (proton pump), alpha subunit (part2)	proton-translocating transhydrogenase family protein
PFEDJJEH_03222	2	1128		NAD/NADP transhydrogenase alpha subunit	Re/Si-specific NAD(P)(+) transhydrogenase subunit alpha
PFEDJJEH_03231	2	2757	acnA	aconitase A	aconitate hydratase AcnA
PFEDJJEH_03236	2	864		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03421	2	330	cbpM	Chaperone modulatory protein CbpM	chaperone modulator CbpM
PFEDJJEH_03474	2	531		hypothetical protein	peptidoglycan hydrolase
PFEDJJEH_03482	2	558		esterase of the alpha/beta hydrolase fold family protein	alpha/beta hydrolase

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_03602	2	1215		hypothetical protein	oxygenase MpaB family protein
PFEDJJEH_03673	2	360		YjgF family translation initiation inhibitor	RidA family protein
PFEDJJEH_03782	2	252		hypothetical protein	GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein
PFEDJJEH_00065	3	1056	hppD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
PFEDJJEH_00067	3	549		putative homogentisate 1,2-dioxygenase	voc family protein
PFEDJJEH_00068	3	633	hmgC	maleylacetoacetate isomerase (MAAI)	maleylacetoacetate isomerase (MAAI)
PFEDJJEH_00069	3	1308	hmgB	fumarylacetoacetase (fumarylacetoacetate hydrolase)	fumarylacetoacetase (fumarylacetoacetate hydrolase)
PFEDJJEH_00070	3	1389		aromatic amino acid APC transporter	amino acid permease
PFEDJJEH_00167	3	768	omp25	putative porin	putative porin
PFEDJJEH_00236	3	444		hypothetical protein	*No significant similarity found*
PFEDJJEH_00263	3	2190		putative sulfate permease	SulP family inorganic anion transporter
PFEDJJEH_00351	3	564		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00363	3	828		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00391	3	681	mlaD	ABC-type transport system	outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MlaD
PFEDJJEH_00392	3	642		putative toluene tolerance protein (Ttg2D)	ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_00393	3	288		putative toluene-tolerance protein (Ttg2E)	STAS domain-containing protein
PFEDJJEH_00465	3	714		hypothetical protein	DUF3108 domain-containing protein
PFEDJJEH_00566	3	384		hypothetical protein	RcnB family protein
PFEDJJEH_00572	3	381		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00573	3	1557	baeS	kinase sensor component of a two component signal transduction system	sensor histidine kinase efflux regulator BaeS
PFEDJJEH_00574	3	687		response regulator	response regulator
PFEDJJEH_00630	3	825		TPR repeat-containing SEL1 subfamily protein	tetratricopeptide repeat protein
PFEDJJEH_00736	3	696	lolA_1	outer-membrane lipoproteins carrier protein	outer membrane lipoprotein chaperone LolA
PFEDJJEH_00809	3	3096		cation/multidrug efflux pump	multidrug efflux RND transporter permease subunit
PFEDJJEH_00815	3	1113		soluble lytic transglycosylase fused to an ABC-type amino acid-binding protein	transglycosylase SLT domain-containing protein
PFEDJJEH_00981	3	702		periplasmic/secreted protein	SIMPL domain-containing protein
PFEDJJEH_01002	3	423		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01312	3	786		Zn-dependent protease with chaperone function	M48 family metallopeptidase
PFEDJJEH_01391	3	702		hypothetical protein	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase family metallohydrolase
PFEDJJEH_01417	3	1584		allophanate hydrolase	5-oxoprolinase/urea amidolyase family protein
PFEDJJEH_01418	3	1719	bccA	acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	biotin carboxylase N-terminal domain-containing protein
PFEDJJEH_01485	3	2103	paaZ	bifunctional aldehyde dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase	phenylacetic acid degradation bifunctional protein paaZ
PFEDJJEH_01488	3	756	paaC	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit C	phenylacetate-CoA oxygenase subunit paaC
PFEDJJEH_01490	3	1062	paaK	flavodoxin reductase (ferredoxin-NADPH reductase) family protein 1	phenylacetate-CoA oxygenase/reductase subunit PaaK
PFEDJJEH_01491	3	774		enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	enoyl-CoA hydratase-related protein
PFEDJJEH_01492	3	792	paaG	enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	2-(1,2-epoxy-1,2-dihydrophenyl)acetyl-CoA isomerase PaaG

AB121-D0					
Locus TAG	Module	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_01504	3	627		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01521	3	1215		4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase
PFEDJJEH_01664	3	336		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01700	3	351		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01934	3	987		lipoyl synthase	lipoyl synthase
PFEDJJEH_01935	3	963		pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) component, alpha subunit	thiamine pyrophosphate-dependent dehydrogenase E1 component subunit alpha
PFEDJJEH_01936	3	1020		acetoin:26-dichlorophenolindophenol oxidoreductase beta subunit	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta
PFEDJJEH_01937	3	1536		pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide acyltransferase (E2) component	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2
PFEDJJEH_01938	3	1404		pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) component	dihydrolipoyl dehydrogenase
PFEDJJEH_01996	3	1782		5'-nucleotidase/2',3'-cyclic phosphodiesterase	bifunctional metallophosphatase/5'-nucleotidase
PFEDJJEH_02148	3	729		fructose-2,6-bisphosphatase	histidine phosphatase family protein
PFEDJJEH_02149	3	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02150	3	990		aminoglycoside phosphotransferase	phosphotransferase family protein
PFEDJJEH_02196	3	834		3-dehydroquinate dehydratase	catabolic 3-dehydroquinate dehydratase
PFEDJJEH_02275	3	747		hypothetical protein	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_02276	3	1407		gamma-aminobutyrate permease	amino acid permease
PFEDJJEH_02277	3	1251		kynureninase	kynureninase
PFEDJJEH_02412	3	282		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02491	3	423		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02492	3	504		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02493	3	1005		coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase	LLM class flavin-dependent oxidoreductase
PFEDJJEH_02586	3	1437		putative Zn-dependent protease	peptidase M48 family protein
PFEDJJEH_02598	3	381		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02666	3	1071		outer membrane protein W	OmpW family protein
PFEDJJEH_02834	3	165		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02937	3	654		outer membrane protein, related peptidoglycan-associated (lipo)protein	OmpA family protein
PFEDJJEH_02968	3	957		flavodoxin reductase (ferredoxin-NADPH reductase) family protein 1	PDR/VanB family oxidoreductase
PFEDJJEH_02969	3	1452		NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	NAD-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_02970	3	1116		dioxygenase alpha subunit	SRPBCC family protein or Rieske 2Fe-2S domain-containing protein
PFEDJJEH_02987	3	579	lolB	outer membrane lipoprotein	lipoprotein insertase outer membrane protein LolB
PFEDJJEH_03247	3	1341		membrane-fusion protein	MacA family efflux pump subunit
PFEDJJEH_03248	3	1995		peptide ABC transporter permease	MacB family efflux pump subunit
PFEDJJEH_03249	3	1407		putative outer membrane protein precursor	efflux transporter, outer membrane factor (OMF) lipo, NodT family protein

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_03265	3	2316		exporter	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
PFEDJJEH_03266	3	630	lolA_2	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA
PFEDJJEH_03267	3	429		thioesterase	acyl-CoA thioesterase
PFEDJJEH_03268	3	1536		histidine ammonia-lyase	aromatic amino acid ammonia-lyase
PFEDJJEH_03269	3	471		acyltransferase	lipid A biosynthesis (KDO)2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase
PFEDJJEH_03270	3	456		acyltransferase	acyltransferase
PFEDJJEH_03271	3	741		glycosyltransferase	glycosyltransferase family 2 protein
PFEDJJEH_03272	3	1659		acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligase	AMP-binding protein
PFEDJJEH_03273	3	555	ispZ	hypothetical protein	septation protein IspZ
PFEDJJEH_03274	3	249		acyl carrier protein	acyl carrier protein
PFEDJJEH_03275	3	261		acyl carrier protein	phosphopantetheine-binding protein
PFEDJJEH_03276	3	795		1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	lysophospholipid acyltransferase family protein
PFEDJJEH_03489	3	357		hypothetical protein	lysozyme inhibitor LprI family protein
PFEDJJEH_03494	3	357		hypothetical protein	YMGG-like glycine zipper-containing protein
PFEDJJEH_03497	3	366		hypothetical protein	*No significant similarity found*
PFEDJJEH_03582	3	624		Rossmann fold nucleotide-binding protein	TIGR00730 family Rossman fold protein
PFEDJJEH_03615	3	600		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03724	3	168		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03731	3	618		Thiol-disulfide isomerase and thioredoxin	thiol:disulfide interchange protein DsbA/DsbL
PFEDJJEH_03735	3	411		hypothetical protein	RcnB family protein
PFEDJJEH_03736	3	321		hypothetical protein	RcnB family protein
PFEDJJEH_03737	3	1356		N-acetylglutamate synthase	amino-acid N-acetyltransferase
PFEDJJEH_03738	3	969		alkanesulfonate transport protein	sulfonate ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_03759	3	327		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03803	3	327		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00077	4	1539	hutH	histidine ammonia-lyase	histidine ammonia-lyase
PFEDJJEH_00078	4	1413		gamma-aminobutyrate permease	amino acid permease
PFEDJJEH_00079	4	1206	hutI	imidazolonepropionase	imidazolonepropionase
PFEDJJEH_00080	4	954	hutG	arginase/agmatinase/formimionoglutamate hydrolase	arginase/agmatinase/formimionoglutamate hydrolase
PFEDJJEH_00129	4	726	ompK	nucleoside-binding outer membrane protein	outer membrane protein OmpK
PFEDJJEH_00188	4	900	omp	34 kDa outer membrane protein	porin Omp33-36
PFEDJJEH_00205	4	1293		4-aminobutyrate aminotransferase	4-aminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase
PFEDJJEH_00298	4	642		Tfp pilus assembly protein PilN	PilN domain-containing protein
PFEDJJEH_00299	4	741	pilO	putative membrane protein (ComO)	type 4a pilus biogenesis protein PilO
PFEDJJEH_00300	4	528	pilP	Tfp pilus assembly protein PilP	pilus assembly protein PilP
PFEDJJEH_00311	4	462		Tfp pilus assembly protein, major pilin PilA	pilin
PFEDJJEH_00371	4	831		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00414	4	321	rplW	50S ribosomal protein L23	50S ribosomal protein L23
PFEDJJEH_00415	4	825	rplB	50S ribosomal protein L2	50S ribosomal protein L2

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_00416	4	276	rpsS	30S ribosomal protein S19	30S ribosomal protein S19
PFEDJJEH_00417	4	330	rplV	50S ribosomal protein L22	50S ribosomal protein L22
PFEDJJEH_00418	4	753		30S ribosomal protein S3	30S ribosomal protein S3
PFEDJJEH_00419	4	414	rplP	50S ribosomal protein L16	50S ribosomal protein L16
PFEDJJEH_00420	4	198	rpmC	50S ribosomal protein L29	50S ribosomal protein L29
PFEDJJEH_00421	4	258	rpsQ	30S ribosomal protein S17	30S ribosomal protein S17
PFEDJJEH_00428	4	351	rplR	50S ribosomal protein L18	50S ribosomal protein L18
PFEDJJEH_00429	4	498	rpsE	30S ribosomal protein S5	30S ribosomal protein S5
PFEDJJEH_00431	4	441	rplO	50S ribosomal protein L15	50S ribosomal protein L15
PFEDJJEH_00432	4	1353	secY	preprotein translocase subunit SecY	Preprotein translocase subunit SecY
PFEDJJEH_00433	4	117	rpmJ	50S ribosomal protein L36	50S ribosomal protein L36
PFEDJJEH_00434	4	357	rpsM	30S ribosomal protein S13	30S ribosomal protein S13
PFEDJJEH_00542	4	1029		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00545	4	936		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00606	4	1254		carbohydrate-selective porin	porin B
PFEDJJEH_00644	4	2079		methyl-accepting chemotaxis protein	methyl-accepting chemotaxis protein
PFEDJJEH_00904	4	609		esterase of the alpha/beta hydrolase fold family protein	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_00905	4	1008		ABC-type sulfate transport system, periplasmic component	sulfate ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_01225	4	681		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01584	4	660		amino acid ABC transporter membrane protein	amino acid ABC transporter permease
PFEDJJEH_01627	4	1041	tauA	taurine ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	taurine ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_01628	4	795		ABC-type taurine transport system, ATPase component	ATP-binding cassette domain-containing protein
PFEDJJEH_01690	4	438		hypothetical protein	PACE efflux transporter
PFEDJJEH_01699	4	537		putative fimbrial protein precursor (pilin)	type 1 fimbrial protein
PFEDJJEH_01845	4	267	rpsT	30S ribosomal protein S20	30S ribosomal protein S20
PFEDJJEH_01892	4	885		permease	sulfite exporter TauE/SafE family protein
PFEDJJEH_02029	4	1398	adeC	outer membrane protein	multidrug efflux RND transporter outer membrane channel subunit AdeC
PFEDJJEH_02030	4	3111	adeB	cation/multidrug efflux pump	multidrug efflux RND transporter permease subunit AdeB
PFEDJJEH_02031	4	1191	adeA	membrane-fusion protein	multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit AdeA
PFEDJJEH_02117	4	6423		hypothetical protein	DUF637 domain-containing protein
PFEDJJEH_02118	4	1746		hemolysin activation/secretion protein	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein
PFEDJJEH_02433	4	1173		alcohol dehydrogenase, class IV	iron-containing alcohol dehydrogenase
PFEDJJEH_02436	4	1512		NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	aldehyde dehydrogenase family protein
PFEDJJEH_02459	4	429		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02529	4	1299		Na+/H+-dicarboxylate symporter	dicarboxylate/amino acid:cation symporter
PFEDJJEH_02551	4	834	csuC	P pilus assembly protein, chaperone PapD	Csu fimbrial biogenesis chaperone CsuC
PFEDJJEH_02662	4	486		hypothetical protein	DUF3465 domain-containing protein
PFEDJJEH_02882	4	624	betI	transcriptional regulator BetI	transcriptional regulator BetI
PFEDJJEH_02883	4	1473	betB	betaine aldehyde dehydrogenase	betaine-aldehyde dehydrogenase

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_02884	4	1659	betA	choline dehydrogenase	choline dehydrogenase
PFEDJJEH_03185	4	246		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03192	4	360	rplT	50S ribosomal protein L20	50S ribosomal protein L20
PFEDJJEH_03258	4	435		hypothetical protein	excinuclease
PFEDJJEH_03259	4	1227		3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase II	beta-ketoacyl-ACP synthase
PFEDJJEH_03308	4	2232		outer membrane receptor for monomeric catechols	TonB-dependent siderophore receptor
PFEDJJEH_03336	4	156	rpmG	50S ribosomal protein L33	50S ribosomal protein L33
PFEDJJEH_03445	4	402		ribosome-binding factor A	ribosome-binding factor A
PFEDJJEH_03500	4	372		50S ribosomal protein L7/L12	50S ribosomal protein L7/L12
PFEDJJEH_03501	4	507		50S ribosomal protein L10	50S ribosomal protein L10
PFEDJJEH_03591	4	486		hypothetical protein	DUF2938 domain-containing protein
PFEDJJEH_03592	4	567		multimeric flavodoxin WrbA	flavodoxin family protein
PFEDJJEH_03616	4	483		hypothetical protein	DUF2846 domain-containing protein
PFEDJJEH_03617	4	420	atpC	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	F0F1 ATP synthase subunit epsilon
PFEDJJEH_03618	4	1395	atpD	F0F1 ATP synthase subunit beta	F0F1 ATP synthase subunit beta
PFEDJJEH_03619	4	870		F0F1 ATP synthase subunit gamma	F0F1 ATP synthase subunit gamma
PFEDJJEH_03620	4	1545	atpA	F0F1 ATP synthase subunit alpha	F0F1 ATP synthase subunit alpha
PFEDJJEH_03622	4	471	atpF	F0F1 ATP synthase subunit B	F0F1 ATP synthase subunit B
PFEDJJEH_03694	4	1707		D-lactate dehydrogenase	D-lactate dehydrogenase
PFEDJJEH_03695	4	1152	lldD	L-lactate dehydrogenase	FMN-dependent L-lactate dehydrogenase LldD
PFEDJJEH_03696	4	753	lldR	DNA-binding transcriptional repressor LldR	transcriptional regulator LldR
PFEDJJEH_03697	4	1662		L-lactate permease	L-lactate permease
PFEDJJEH_03707	4	1041		hypothetical protein	EpsG family protein
PFEDJJEH_03709	4	1164		hypothetical protein	glycosyltransferase
PFEDJJEH_03710	4	567	dapH	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	acyltransferase
PFEDJJEH_00182	5	768		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00184	5	333	yjcH_1	Inner membrane protein YjcH	DUF485 domain-containing protein
PFEDJJEH_00185	5	1716	actP	acetate permease	cation/acetate symporter ActP
PFEDJJEH_00259	5	1515		acetyl-CoA hydrolase	acetyl-CoA hydrolase/transferase family protein
PFEDJJEH_00379	5	255		putative stress-responsive transcriptional regulator	PspC domain-containing protein
PFEDJJEH_00475	5	528		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00869	5	390		hypothetical protein	DUF3106 domain-containing protein
PFEDJJEH_00870	5	321		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00871	5	615		RNA polymerase factor sigma-70	RNA polymerase sigma factor
PFEDJJEH_01552	5	903		isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthase	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
PFEDJJEH_01553	5	1992		acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha
PFEDJJEH_01554	5	804		enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
PFEDJJEH_01555	5	1602		acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta)	methylcrotonoyl-CoA carboxylase

AB121-D0					
Locus TAG	**Module**	**length (bp)**	**gene**	**product**	**Blast analysis**
PFEDJJEH_01556	5	1173		acyl-CoA dehydrogenase	isovaleryl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_01557	5	618		transcriptional regulator	TetR/AcrR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_01558	5	1695		acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II	AMP-binding protein
PFEDJJEH_01559	5	672		SAM-dependent methyltransferase	class I SAM-dependent methyltransferase
PFEDJJEH_01560	5	1287		putative protein (DcaP-like)	DcaP-like protein
PFEDJJEH_01720	5	231		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01858	5	387	iscU	scaffold protein	Fe-S cluster assembly scaffold IscU
PFEDJJEH_01870	5	303		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01922	5	165		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01933	5	1140		putative transcriptional regulator; putative regulator of acetoin metabolisme	transcriptional regulator
PFEDJJEH_01969	5	1173		acetyl-CoA acetyltransferase	thiolase family protein
PFEDJJEH_01970	5	1410		short chain fatty acids transporter	short-chain fatty acid transporter
PFEDJJEH_01971	5	642		acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, beta subunit	3-oxoacid CoA-transferase subunit B
PFEDJJEH_01972	5	705		acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, alpha subunit	CoA transferase subunit A
PFEDJJEH_01975	5	1422		H+/gluconate symporter	GntP family permease
PFEDJJEH_01976	5	786		3-hydroxybutyrate dehydrogenase	3-hydroxybutyrate dehydrogenase
PFEDJJEH_02270	5	444		putative stress protein	universal stress protein
PFEDJJEH_02427	5	258		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02481	5	1644		putative acetyl-CoA synthetase/AMP-(fatty) acid ligase	AMP-binding enzyme
PFEDJJEH_02482	5	1137		acyl-CoA dehydrogenase	acyl-CoA dehydrogenase family protein
PFEDJJEH_02483	5	771		dehydrogenase	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_03199	5	1629		acyl-CoA synthetase	acyl-CoA synthetase
PFEDJJEH_03300	5	1263	ackA	acetate kinase (propionate kinase)	acetate kinase
PFEDJJEH_03338	5	279		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03343	5	573		hypothetical protein	HdeD family acid-resistance protein
PFEDJJEH_03668	5	891		3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
PFEDJJEH_03669	5	1518	mmsA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, oxidoreductase protein	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_03689	5	2607	acnD	aconitate hydratase	Fe/S-dependent 2-methylisocitrate dehydratase AcnD
PFEDJJEH_03690	5	1158		methylcitrate synthase	2-methylcitrate synthase
PFEDJJEH_03691	5	885	prpB	2-methylisocitrate lyase	methylisocitrate lyase
PFEDJJEH_03692	5	711		GntR family transcriptional regulator	GntR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_03760	5	231		hypothetical protein	hypothetical protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_00184	1	333	yjcH_1	Inner membrane protein YjcH	DUF485 domain-containing protein
PFEDJJEH_01363	1	618	lysE	amino acid transporter LysE	LysE family translocator
PFEDJJEH_01417	1	1584		allophanate hydrolase	5-oxoprolinase/urea amidolyase family protein
PFEDJJEH_01455	1	264		hypothetical protein	PAAR domain-containing protein
PFEDJJEH_02336	1	420	accB	biotin carboxyl carrier protein	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
PFEDJJEH_02337	1	1371	accC	biotin carboxylase	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl subunit
PFEDJJEH_02552	1	519	csuB	putative type 1 pili subunit CsuA/B protein	Csu fimbrial biogenesis protein CsuB
PFEDJJEH_02553	1	549	csuA	protein CsuA	Csu fimbrial biogenesis protein CsuA
PFEDJJEH_03709	1	1164		hypothetical protein	glycosyltransferase
PFEDJJEH_03852	1	141		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03888	1	396		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03889	1	759		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00052	2	159		hypothetical protein	DUF1328 domain-containing protein
PFEDJJEH_00054	2	1173		glucose/sorbosone dehydrogenase	PQQ-dependent sugar dehydrogenase
PFEDJJEH_00102	2	759		accessory colonization factor AcfC	AcfC family putative adhesin
PFEDJJEH_00103	2	1197		putative secretory lipase precursor	alpha/beta fold hydrolase
PFEDJJEH_00134	2	351		hypothetical protein	HPF/RaiA family ribosome-associated protein
PFEDJJEH_00182	2	768		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00216	2	423		hypothetical protein	GFA family protein
PFEDJJEH_00258	2	432		putative acetyltransferase	GNAT family acetyltransferase
PFEDJJEH_00267	2	381		hypothetical protein	SEL1-like repeat protein
PFEDJJEH_00314	2	465	bfr_1	bacterioferritin (cytochrome b1)	bacterioferritin
PFEDJJEH_00336	2	444		hypothetical protein	hemerythrin domain-containing protein
PFEDJJEH_00351	2	564		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00366	2	432		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00367	2	420		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00370	2	285		hypothetical protein	YciI family protein
PFEDJJEH_00379	2	255		putative stress-responsive transcriptional regulator	PspC domain-containing protein
PFEDJJEH_00384	2	951	hemF	coproporphyrinogen III oxidase	coproporphyrinogen III oxidase
PFEDJJEH_00443	2	102		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00474	2	246		hypothetical protein	DUF2789 family protein
PFEDJJEH_00548	2	1269		signal transduction histidine kinase	HAMP domain-containing sensor histidine kinase
PFEDJJEH_00593	2	642		peroxiredoxin	peroxiredoxin
PFEDJJEH_00611	2	444		hypothetical protein	VOC family protein
PFEDJJEH_00633	2	450		hypothetical protein	SRPBCC family protein
PFEDJJEH_00636	2	342		hypothetical protein	YegP family protein
PFEDJJEH_00648	2	141		hypothetical protein	entericidin A/B family lipoprotein
PFEDJJEH_00650	2	369	ybaN	Inner membrane protein YbaN	YbaN family protein
PFEDJJEH_00699	2	876	hchA	chaperone protein HchA	protein deglycase HchA

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_00768	2	6906		putative surface adhesion protein	Ig-like domain repeat protein
PFEDJJEH_00775	2	438		universal stress protein UspA	universal stress protein
PFEDJJEH_00828	2	2409		putative oxidoreductase molybdopterin	FdhF/YdeP family oxidoreductase
PFEDJJEH_00829	2	792	fdhD	putative protein required for formate dehydrogenase activity	formate dehydrogenase accessory sulfurtransferase FdhD
PFEDJJEH_00869	2	390		hypothetical protein	DUF3106 domain-containing protein
PFEDJJEH_00870	2	321		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00888	2	126		hypothetical protein	KGW motif small protein
PFEDJJEH_00899	2	744	carO	putative porin protein associated with imipenem resistance	ornithine uptake porin CarO type 2
PFEDJJEH_00902	2	885	cysW	sulfate ABC transporter membrane protein	sulfate ABC transporter permease subunit CysW
PFEDJJEH_00904	2	609		esterase of the alpha/beta hydrolase fold family protein	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_00905	2	1008		ABC-type sulfate transport system, periplasmic component	sulfate ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_00944	2	1221		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00945	2	1137		UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (non-hydrolyzing)
PFEDJJEH_00947	2	1845		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00948	2	1251		glycosyltransferase	glycosyltransferase family 2 protein
PFEDJJEH_00949	2	897		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00950	2	741		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00959	2	492		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00960	2	411		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00969	2	378		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00993	2	843		putative periplasmic protease	protease SohB
PFEDJJEH_01002	2	423		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01051	2	189		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01109	2	558		TetR family transcriptional regulator	TetR/AcrR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_01111	2	687		Pirin-related protein	pirin-like bicupin family protein
PFEDJJEH_01195	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01240	2	120		hypothetical protein	SOS response-associated peptidase
PFEDJJEH_01250	2	402		transcriptional regulator	MerR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_01287	2	1014	intI1	integrase	class 1 integron integrase IntI1
PFEDJJEH_01318	2	2580	clpB	ATPase with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent chaperone ClpB
PFEDJJEH_01319	2	489	cinA_1	putative protein (competence- and mitomycin-induced)	CinA family protein
PFEDJJEH_01325	2	1416		outer membrane protein	OmpA family protein
PFEDJJEH_01330	2	612	gstA	glutathione S-transferase	glutathione transferase GstA
PFEDJJEH_01331	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01334	2	588		O-methyltransferase	O-methyltransferase
PFEDJJEH_01335	2	216		hypothetical protein	KTSC domain-containing protein
PFEDJJEH_01351	2	357		ferredoxin	four-helix bundle copper-binding protein
PFEDJJEH_01352	2	330		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01368	2	459		hypothetical protein	hypothetical protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_01369	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01370	2	1107		phage putative head morphogenesis protein, SPP1 gp7	minor capsid protein
PFEDJJEH_01375	2	594		hypothetical protein	DUF4142 domain-containing protein
PFEDJJEH_01376	2	630		putative surface antigen	hypothetical protein
PFEDJJEH_01389	2	843		universal stress protein UspA	universal stress protein
PFEDJJEH_01401	2	438		hypothetical protein	DUF2147 domain-containing protein
PFEDJJEH_01405	2	459		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01415	2	765	pxpA	LamB/YcsF family protein	5-oxoprolinase subunit PxpA
PFEDJJEH_01416	2	807		Putative hydro-lyase	putative hydro-lyase
PFEDJJEH_01426	2	1164		threonine dehydrogenase	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_01436	2	540		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01468	2	570	queH	Epoxyqueuosine reductase QueH	epoxyqueuosine reductase QueH
PFEDJJEH_01471	2	435		putative hemolysin	I78 family peptidase inhibitor
PFEDJJEH_01472	2	99		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01500	2	849	secC	SecC motif-containing protein	zinc chelation protein SecC
PFEDJJEH_01501	2	1197		hypothetical protein	reverse transcriptase domain-containing protein
PFEDJJEH_01550	2	3483		indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase family protein
PFEDJJEH_01552	2	903		isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthase	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
PFEDJJEH_01553	2	1992		acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha
PFEDJJEH_01554	2	804		enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
PFEDJJEH_01555	2	1602		acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta)	methylcrotonoyl-CoA carboxylase
PFEDJJEH_01556	2	1173		acyl-CoA dehydrogenase	isovaleryl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_01558	2	1695		acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II	AMP-binding protein
PFEDJJEH_01565	2	144		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01566	2	429		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01567	2	222		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01568	2	318		putative 17 kDa surface antigen	surface antigen protein 1
PFEDJJEH_01569	2	222		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01570	2	480	cinA_2	putative competence-damaged protein	CinA family protein
PFEDJJEH_01571	2	1410		hypothetical protein	iron-containing redox enzyme family protein
PFEDJJEH_01572	2	2139		catalase	catalase HPII
PFEDJJEH_01573	2	879		dehydrogenase	SDR family oxidoreductase
PFEDJJEH_01574	2	414		hypothetical protein	DUF6367 family protein
PFEDJJEH_01575	2	1173		hypothetical protein	KGG domain-containing protein
PFEDJJEH_01578	2	612		putative threonine efflux protein	LysE family translocator
PFEDJJEH_01583	2	285		acetyltransferase	GNAT family N-acetyltransferase
PFEDJJEH_01587	2	861		amino acid ABC transporter periplasmic protein	transporter substrate-binding domain-containing protein
PFEDJJEH_01588	2	867		amino acid ABC transporter periplasmic protein	cysteine ABC transporter substrate-binding protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_01592	2	933		putative major membrane protein I (MMP-I) (35 kDa antigen)	family 2A encapsulin nanocompartment shell protein
PFEDJJEH_01593	2	924		serine acetyltransferase	serine acetyltransferase
PFEDJJEH_01594	2	510		rhodanese-related sulfurtransferase	rhodanese-like domain-containing protein
PFEDJJEH_01597	2	861		glutathione S-transferase	glutathione-dependent disulfide-bond oxidoreductase
PFEDJJEH_01598	2	627		glutathione S-transferase	glutathione transferase
PFEDJJEH_01627	2	1041	tauA	taurine ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	taurine ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_01628	2	795		ABC-type taurine transport system, ATPase component	ATP-binding cassette domain-containing protein
PFEDJJEH_01629	2	870	tauC	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, permease component	taurine ABC transporter permease TauC
PFEDJJEH_01630	2	882	tauD	taurine dioxygenase	taurine dioxygenase
PFEDJJEH_01653	2	420	msrB	peptide methionine sulfoxide reductase domain-containing protein	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase MsrB
PFEDJJEH_01654	2	486		glutathione peroxidase	glutathione peroxidase
PFEDJJEH_01655	2	846		AraC family transcriptional regulator	AraC family transcriptional regulator
PFEDJJEH_01660	2	390		putative protein.1	tautomerase family protein
PFEDJJEH_01664	2	336		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01671	2	831		ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface antigen	MetQ/NlpA family ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_01672	2	1413		coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase	LLM class flavin-dependent oxidoreductase
PFEDJJEH_01673	2	1224		acyl-CoA dehydrogenase	SfnB family sulfur acquisition oxidoreductase
PFEDJJEH_01684	2	561		transcriptional regulator	TetR/AcrR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_01688	2	99		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01692	2	465		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01693	2	930		DMT family permease	DMT family permease
PFEDJJEH_01712	2	186		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01713	2	249		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01716	2	408		redox protein, regulator of disulfide bond formation	OsmC family protein
PFEDJJEH_01717	2	591	yceI	Protein YceI	YceI family protein, partial
PFEDJJEH_01720	2	231		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01795	2	399		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01806	2	1173		hypothetical protein	phage major capsid protein
PFEDJJEH_01846	2	666		nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	nucleoside-diphosphate sugar epimerase
PFEDJJEH_01870	2	303		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01884	2	2148		HAD-superfamily hydrolase	HAD family hydrolase
PFEDJJEH_01909	2	426		hypothetical protein	GFA family protein
PFEDJJEH_01910	2	201		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01916	2	237		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01920	2	267		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01922	2	165		hypothetical protein	hypothetical protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_01957	2	1431		ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, periplasmic component	ABC transporter substrate-binding protein
PFEDJJEH_01964	2	1419		aspartate ammonia-lyase	aspartate ammonia-lyase
PFEDJJEH_01971	2	642		acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, beta subunit	3-oxoacid CoA-transferase subunit B
PFEDJJEH_01972	2	705		acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, alpha subunit	CoA transferase subunit A
PFEDJJEH_02006	2	177		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02007	2	237		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02010	2	468		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02011	2	366		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02013	2	1872		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02020	2	291		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02044	2	1104		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02115	2	141		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02126	2	693		putative intracellular protease/amidase	type 1 glutamine amidotransferase domain-containing protein
PFEDJJEH_02138	2	831		alpha/beta superfamily hydrolase/acyltransferase	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_02139	2	894		hypothetical protein	acetoacetate decarboxylase family protein
PFEDJJEH_02208	2	678		hypothetical protein	DUF421 domain-containing protein
PFEDJJEH_02238	2	195		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02245	2	597		nitroreductase-like oxidoreductase	nitroreductase family protein
PFEDJJEH_02248	2	360		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02250	2	426		hypothetical protein	DUF2750 domain-containing protein
PFEDJJEH_02251	2	432		CBS domain-containing protein	CBS domain-containing protein
PFEDJJEH_02254	2	324		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02265	2	171		hypothetical protein	PEGA domain-containing protein
PFEDJJEH_02270	2	444		putative stress protein	universal stress protein
PFEDJJEH_02271	2	1443		glucose/sorbosone dehydrogenase	PQQ-dependent sugar dehydrogenase
PFEDJJEH_02272	2	639		hypothetical protein	SOS response-associated peptidase family protein
PFEDJJEH_02280	2	294		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02307	2	1245	dadA	D-amino acid dehydrogenase small subunit	D-amino acid dehydrogenase
PFEDJJEH_02310	2	297		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02311	2	1395	fumC	fumarate hydratase	class II fumarate hydratase
PFEDJJEH_02312	2	1008	galE	UDP-glucose 4-epimerase	UDP-glucose 4-epimerase GalE
PFEDJJEH_02338	2	504		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02372	2	864		hypothetical protein	iron-containing redox enzyme family protein
PFEDJJEH_02394	2	990		transaldolase B	transaldolase B
PFEDJJEH_02404	2	444		universal stress protein UspA	universal stress protein
PFEDJJEH_02406	2	426	pliG	Inhibitor of g-type lysozyme	DNA breaking-rejoining protein
PFEDJJEH_02407	2	132		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02412	2	282		hypothetical protein	hypothetical protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_02413	2	471		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02414	2	252		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02427	2	258		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02448	2	945	miaA	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase	tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA
PFEDJJEH_02453	2	444		histone acetyltransferase HPA2	GNAT family N-acetyltransferase
PFEDJJEH_02455	2	219		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02483	2	771		dehydrogenase	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_02513	2	780		transglutaminase-like enzyme, putative cysteine protease	transglutaminase family protein
PFEDJJEH_02514	2	597		hypothetical protein	alpha-E domain-containing protein
PFEDJJEH_02515	2	1551		putative protein	circularly permuted type 2 ATP-grasp protein
PFEDJJEH_02518	2	231		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02528	2	204		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02532	2	453		hypothetical protein	GNAT family N-acetyltransferase
PFEDJJEH_02533	2	1368		hypothetical protein	sorbosone dehydrogenase family protein
PFEDJJEH_02538	2	807	pqiA	paraquat-inducible protein A (part 2)	paraquat-inducible protein A
PFEDJJEH_02540	2	1686	aspT	permease	aspartate-alanine antiporter
PFEDJJEH_02541	2	1053		aspartate aminotransferase	bifunctional aspartate transaminase/aspartate 4-decarboxylase
PFEDJJEH_02565	2	363		putative protein	NirD/YgiW/YdeI family stress tolerance protein
PFEDJJEH_02566	2	645		glycosyltransferase	glycosyltransferase
PFEDJJEH_02567	2	600		SAM-dependent methyltransferase	class I SAM-dependent methyltransferase
PFEDJJEH_02568	2	795		LmbE protein	PIG-L family deacetylase
PFEDJJEH_02569	2	990		putative acyl-CoA dehydrogenase-related protein	acyl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_02570	2	234		hypothetical protein	DUF2171 domain-containing protein
PFEDJJEH_02572	2	1569		NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)
PFEDJJEH_02573	2	1377		beta alanine--pyruvate transaminase	aspartate aminotransferase family protein
PFEDJJEH_02598	2	381		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02628	2	1269		hypothetical protein	DUF4010 domain-containing protein
PFEDJJEH_02633	2	1371	yegQ	putative protease	tRNA 5-hydroxyuridine modification protein YegQ
PFEDJJEH_02634	2	264		ferredoxin	YfhL family 4Fe-4S dicluster ferredoxin
PFEDJJEH_02672	2	2466		acyl-CoA dehydrogenase	acyl-CoA dehydrogenase
PFEDJJEH_02706	2	732		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02743	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02801	2	480	nlpE	putative lipoprotein NlpE involved in copper resistance	copper resistance protein NlpE
PFEDJJEH_02834	2	165		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02845	2	1146		galactose mutarotase	galactose mutarotase
PFEDJJEH_02933	2	1419		phosphomannomutase	phosphomannomutase/phosphoglucomutase
PFEDJJEH_02937	2	654		outer membrane protein, related peptidoglycan-associated (lipo)protein	OmpA family protein
PFEDJJEH_03001	2	474	lysM	LysM domain/BON superfamily protein	peptidoglycan-binding protein LysM
PFEDJJEH_03017	2	852		trehalose-6-phosphatase	trehalose-6-phosphatase

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_03018	2	1431		trehalose-6-phosphate synthase	trehalose-6-phosphate synthase
PFEDJJEH_03041	2	501		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03043	2	189		hypothetical protein	NF038215 family lipoprotein
PFEDJJEH_03051	2	1677		hypothetical protein	mechanosensitive ion channel
PFEDJJEH_03052	2	228		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03072	2	354		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03089	2	513		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03095	2	2925		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03121	2	1020	add	adenosine deaminase	adenosine deaminase
PFEDJJEH_03159	2	339	raiA	ribosome-associated protein Y (PSrp-1)	ribosome-associated translation inhibitor RaiA
PFEDJJEH_03231	2	2757	acnA	aconitase A	aconitate hydratase AcnA
PFEDJJEH_03288	2	552		membrane-associated phospholipid phosphatase	phosphatase PAP2 family protein
PFEDJJEH_03343	2	573		hypothetical protein	HdeD family acid-resistance protein
PFEDJJEH_03363	2	369		hypothetical protein	lysozyme inhibitor LprI family protein
PFEDJJEH_03413	2	345		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03420	2	957		DnaJ-class molecular chaperone	DnaJ C-terminal domain-containing protein
PFEDJJEH_03421	2	330	cbpM	Chaperone modulatory protein CbpM	chaperone modulator CbpM
PFEDJJEH_03429	2	507		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03482	2	558		esterase of the alpha/beta hydrolase fold family protein	alpha/beta hydrolase
PFEDJJEH_03486	2	1140		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03489	2	357		hypothetical protein	lysozyme inhibitor LprI family protein
PFEDJJEH_03490	2	582		putative outer membrane protein W	outer membrane beta-barrel protein
PFEDJJEH_03494	2	357		hypothetical protein	YMGG-like glycine zipper-containing protein
PFEDJJEH_03602	2	1215		hypothetical protein	oxygenase MpaB family protein
PFEDJJEH_03668	2	891		3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase
PFEDJJEH_03669	2	1518	mmsA	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, oxidoreductase protein	CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_03679	2	381		hypothetical protein	nuclear transport factor 2 family protein
PFEDJJEH_03684	2	474		hypothetical protein	DUF4844 domain-containing protein
PFEDJJEH_03687	2	390		hypothetical protein	DUF4126 domain-containing protein, partial
PFEDJJEH_03688	2	267		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03750	2	543		flavoprotein	NAD(P)H-dependent oxidoreductase
PFEDJJEH_03760	2	231		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03782	2	252		hypothetical protein	GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein
PFEDJJEH_03842	2	252		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00076	3	1677	hutU	urocanate hydratase	urocanate hydratase
PFEDJJEH_00077	3	1539	hutH	histidine ammonia-lyase	histidine ammonia-lyase
PFEDJJEH_00078	3	1413		gamma-aminobutyrate permease	amino acid permease
PFEDJJEH_00079	3	1206	hutI	imidazolonepropionase	imidazolonepropionase
PFEDJJEH_00188	3	900	omp	34 kDa outer membrane protein	porin Omp33-36

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_00211	3	1647		IS66 family transposase ISAba17	IS66-like element ISAba17 family transposase
PFEDJJEH_00328	3	252		30S ribosomal protein S16	30S ribosomal protein S16
PFEDJJEH_00329	3	549	rimM	16S rRNA-processing protein RimM	ribosome maturation factor RimM
PFEDJJEH_00330	3	741	trmD	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	tRNA (guanosine(37)-N1)-methyltransferase TrmD
PFEDJJEH_00331	3	369	rplS	50S ribosomal protein L19	50S ribosomal protein L19
PFEDJJEH_00345	3	1230		major facilitator superfamily permease	MFS transporter
PFEDJJEH_00388	3	1848		superfamily II DNA/RNA helicase	DEAD/DEAH box helicase
PFEDJJEH_00411	3	312	rpsJ	30S ribosomal protein S10	30S ribosomal protein S10
PFEDJJEH_00412	3	639		50S ribosomal protein L3	50S ribosomal protein L3
PFEDJJEH_00413	3	603	rplD	50S ribosomal protein L4	50S ribosomal protein L4
PFEDJJEH_00414	3	321	rplW	50S ribosomal protein L23	50S ribosomal protein L23
PFEDJJEH_00415	3	825	rplB	50S ribosomal protein L2	50S ribosomal protein L2
PFEDJJEH_00416	3	276	rpsS	30S ribosomal protein S19	30S ribosomal protein S19
PFEDJJEH_00417	3	330	rplV	50S ribosomal protein L22	50S ribosomal protein L22
PFEDJJEH_00418	3	753		30S ribosomal protein S3	30S ribosomal protein S3
PFEDJJEH_00419	3	414	rplP	50S ribosomal protein L16	50S ribosomal protein L16
PFEDJJEH_00420	3	198	rpmC	50S ribosomal protein L29	50S ribosomal protein L29
PFEDJJEH_00421	3	258	rpsQ	30S ribosomal protein S17	30S ribosomal protein S17
PFEDJJEH_00422	3	369	rplN	50S ribosomal protein L14	50S ribosomal protein L14
PFEDJJEH_00423	3	318	rplX	50S ribosomal protein L24	50S ribosomal protein L24
PFEDJJEH_00424	3	537		50S ribosomal protein L5	50S ribosomal protein L5
PFEDJJEH_00425	3	306		30S ribosomal protein S14	30S ribosomal protein S14
PFEDJJEH_00426	3	396	rpsH	30S ribosomal protein S8	30S ribosomal protein S8
PFEDJJEH_00427	3	534		50S ribosomal protein L6	50S ribosomal protein L6
PFEDJJEH_00428	3	351	rplR	50S ribosomal protein L18	50S ribosomal protein L18
PFEDJJEH_00429	3	498	rpsE	30S ribosomal protein S5	30S ribosomal protein S5
PFEDJJEH_00430	3	177	rpmD	50S ribosomal protein L30	50S ribosomal protein L30
PFEDJJEH_00431	3	441	rplO	50S ribosomal protein L15	50S ribosomal protein L15
PFEDJJEH_00432	3	1353	secY	preprotein translocase subunit SecY	Preprotein translocase subunit SecY
PFEDJJEH_00433	3	117	rpmJ	50S ribosomal protein L36	50S ribosomal protein L36
PFEDJJEH_00434	3	357	rpsM	30S ribosomal protein S13	30S ribosomal protein S13
PFEDJJEH_00435	3	387	rpsK	30S ribosomal protein S11	30S ribosomal protein S11
PFEDJJEH_00436	3	627	rpsD	30S ribosomal protein S4	30S ribosomal protein S4
PFEDJJEH_00437	3	1008	rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
PFEDJJEH_00438	3	378	rplQ	50S ribosomal protein L17	50S ribosomal protein L17
PFEDJJEH_00498	3	387	rpsI	ribosomal protein S9	30S ribosomal protein S9
PFEDJJEH_00566	3	384		hypothetical protein	RcnB family protein
PFEDJJEH_00572	3	381		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_00616	3	1206	rtcB	RNA-splicing ligase RtcB	RtcB family protein

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_00665	3	1476		Na+/alanine symporter	alanine/glycine:cation symporter family protein
PFEDJJEH_00815	3	1113		soluble lytic transglycosylase fused to an ABC-type amino acid-binding protein	transglycosylase SLT domain-containing protein
PFEDJJEH_01011	3	225	rpmE_1	50S ribosomal protein L31	50S ribosomal protein L31
PFEDJJEH_01358	3	234		putative transposase	transposase
PFEDJJEH_01365	3	225		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_01448	3	477	tssE	hypothetical protein	type VI secretion system baseplate subunit TssE
PFEDJJEH_01650	3	1068		L-asparaginase/ Glu-tRNAGln amidotransferase subunit D	type II asparaginase
PFEDJJEH_01690	3	438		hypothetical protein	PACE efflux transporter
PFEDJJEH_01845	3	267	rpsT	30S ribosomal protein S20	30S ribosomal protein S20
PFEDJJEH_02029	3	1398	adeC	outer membrane protein	multidrug efflux RND transporter outer membrane channel subunit AdeC
PFEDJJEH_02030	3	3111	adeB	cation/multidrug efflux pump	multidrug efflux RND transporter permease subunit AdeB
PFEDJJEH_02031	3	1191	adeA	membrane-fusion protein	multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit AdeA
PFEDJJEH_02051	3	1329		outer membrane protein	TolC family protein
PFEDJJEH_02118	3	1746		hemolysin activation/secretion protein	ShlB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein
PFEDJJEH_02350	3	651		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02491	3	423		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02492	3	504		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02505	3	330	cyoD	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV
PFEDJJEH_02507	3	384	rpsF	30S ribosomal protein S6	30S ribosomal protein S6
PFEDJJEH_02508	3	228	rpsR	30S ribosomal protein S18	30S ribosomal protein S18
PFEDJJEH_02509	3	447	rplI	50S ribosomal protein L9	50S ribosomal protein L9
PFEDJJEH_02557	3	714		transcriptional regulator	GntR family transcriptional regulator or FadR family transcriptional regulator
PFEDJJEH_02662	3	486		hypothetical protein	DUF3465 domain-containing protein
PFEDJJEH_02664	3	753	rpsB	30S ribosomal protein S2	30S ribosomal protein S2
PFEDJJEH_02716	3	324		hypothetical protein	DUF4236 domain-containing protein
PFEDJJEH_02777	3	780		small protein A (tmRNA-binding)	OmpA family protein
PFEDJJEH_02778	3	6798	ata	Adhesin Ata autotransporter	trimeric autotransporter adhesin Ata
PFEDJJEH_02810	3	99		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_02881	3	1623		putative choline/carnitine/betaine transporter family protein	BCCT family transporter
PFEDJJEH_02882	3	624	betI	transcriptional regulator BetI	transcriptional regulator BetI
PFEDJJEH_02883	3	1473	betB	betaine aldehyde dehydrogenase	betaine-aldehyde dehydrogenase
PFEDJJEH_02884	3	1659	betA	choline dehydrogenase	choline dehydrogenase
PFEDJJEH_02957	3	2139	fusA	elongation factor G	translation elongation factor G
PFEDJJEH_02958	3	471	rpsG	30S ribosomal protein S7	30S ribosomal protein S7
PFEDJJEH_02993	3	297		50S ribosomal protein L25	50S ribosomal protein L25

AB122-D12					
Locus TAG	module_id	length (bp)	gene	product	Blast analysis
PFEDJJEH_03148	3	870		hypothetical protein	C39 family peptidase
PFEDJJEH_03185	3	246		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03192	3	360	rplT	50S ribosomal protein L20	50S ribosomal protein L20
PFEDJJEH_03193	3	195	rpmI	50S ribosomal protein L35	50S ribosomal protein L35
PFEDJJEH_03241	3	492	ilvN	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	acetolactate synthase small subunit
PFEDJJEH_03336	3	156	rpmG	50S ribosomal protein L33	50S ribosomal protein L33
PFEDJJEH_03362	3	222	infA	translation initiation factor IF-1	translation initiation factor IF-1
PFEDJJEH_03445	3	402		ribosome-binding factor A	ribosome-binding factor A
PFEDJJEH_03446	3	2700		translation initiation factor IF-2	translation initiation factor IF-2
PFEDJJEH_03447	3	1485	nusA	transcription elongation factor NusA	transcription termination factor NusA
PFEDJJEH_03500	3	372		50S ribosomal protein L7/L12	50S ribosomal protein L7/L12
PFEDJJEH_03501	3	507		50S ribosomal protein L10	50S ribosomal protein L10
PFEDJJEH_03502	3	696	rplA	50S ribosomal protein L1	50S ribosomal protein L1
PFEDJJEH_03503	3	429	rplK	50S ribosomal protein L11	50S ribosomal protein L11
PFEDJJEH_03617	3	420	atpC	F0F1 ATP synthase subunit epsilon	F0F1 ATP synthase subunit epsilon
PFEDJJEH_03618	3	1395	atpD	F0F1 ATP synthase subunit beta	F0F1 ATP synthase subunit beta
PFEDJJEH_03619	3	870	atpG	F0F1 ATP synthase subunit gamma	F0F1 ATP synthase subunit gamma
PFEDJJEH_03620	3	1545	atpA	F0F1 ATP synthase subunit alpha	F0F1 ATP synthase subunit alpha
PFEDJJEH_03622	3	471	atpF	F0F1 ATP synthase subunit B	F0F1 ATP synthase subunit B
PFEDJJEH_03623	3	246	atpE	F0F1-type ATP synthase subunit c/vacuolar-type proton-ATPase subunit K	F0F1 ATP synthase subunit C
PFEDJJEH_03624	3	876	atpB	F0F1 ATP synthase subunit A	F0F1 ATP synthase subunit A
PFEDJJEH_03736	3	321		hypothetical protein	RcnB family protein
PFEDJJEH_03787	3	1761	yidC	putative inner membrane protein translocase component YidC	membrane protein insertase YidC
PFEDJJEH_03788	3	321	yidD	Putative membrane protein insertion efficiency factor	membrane protein insertion efficiency factor YidD
PFEDJJEH_03863	3	498		hypothetical protein	hypothetical protein
PFEDJJEH_03864	3	411		hypothetical protein	type I restriction-modification system subunit M

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

Ce travail de thèse a permis d'appréhender les avantages et les limites de la modélisation PK/PD semi-mécanistique par rapport à l'approche traditionnelle qui utilise des index PK/PD dérivés de la CMI, et d'évaluer l'effet de diverses conditions expérimentales (choix de l'inoculum de départ, forte concentration en nutriments dans les milieux de culture, et présence de mucine pour se rapprocher de l'environnement pulmonaire) sur les résultats de ces modélisations *in vitro,* et par conséquent sur leur capacité de prédire l'effet des antibiotiques *in vivo*.

1. Apport de la modélisation PK/PD semi-mécanistique

1.1. Modélisation PD *in vitro* de l'effet inoculum

L'approche traditionnelle pour étudier l'effet inoculum consiste à faire varier l'inoculum de départ des tests de CMI, standardisé à 5.10^5 UFC/mL. Néanmoins, ceci soulève un problème conceptuel. Tout d'abord la CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle aucun trouble ne peut être détecté visuellement après 20h de culture. Il est communément admis que le trouble apparaît dès que les UFC/mL atteignent des valeurs $\geq 10^7$ (356). Comme rappelé en introduction, la CMI ne correspond pas à une concentration pour laquelle une valeur précisément définie de UFC est atteinte en 20h, mais à la plus faible concentration pour laquelle les UFC/mL sont $<10^7$.

Considérons pour la suite, afin de lever cette difficulté liée à l'imprécision de l'estimation de la CMI et pour clarifier la discussion, que la CMI est la concentration d'antibiotique pour laquelle la valeur des UFC/mL est exactement égale à 10^7 au temps 20h. Et considérons aussi pour simplifier et mieux appréhender l'effet inoculum que celui-ci est étudié à partir des 4 inocula de départ suivant : 10^5, 10^6, 10^7 et 10^8 UFC/mL. Ainsi, étudier un effet inoculum à partir des mesures de CMI, reviendrait pour les deux premiers, à comparer les concentrations d'antibiotique pour lesquelles la croissance bactérienne augmenterait en 20h de 10^5 à 10^7 ou de 10^6 à 10^7 UFC/mL. Et pour les inocula de départ $\geq 10^7$ UFC/mL, comme le seuil théorique de

10^7 UFC/mL est déjà atteint, d'autres critères doivent être définis comme une croissance nette nulle ou bien une décroissance pour revenir à 10^7 UFC/mL. Par ailleurs, ces forts inocula nécessitent une méthode de lecture alternative du fait du trouble préalable induit dans le milieu par l'inoculum de départ.

Il est alors possible de se demander si une différence de CMI en fonction de l'inoculum, traduit une véritable modification de l'activité antimicrobienne intrinsèque, ou s'il ne faudrait pas plutôt comparer les concentrations d'antibiotique correspondant à une même augmentation des UFC/mL, par exemple de 2 log (*i.e.* de 10^5 à 10^7, de 10^6 à 10^8, de 10^7 à 10^9 et même d'un point de vue théorique de 10^8 à 10^{10} UFC/mL).

La modélisation PD permet de s'affranchir de cette difficulté, en décrivant l'évolution de la concentration bactérienne au cours du temps et en permettant de différencier la croissance bactérienne de l'effet de l'antibiotique dans le temps grâce aux équations différentielles (Equation 1) :

$$\frac{d(Bact)}{d(t)} = k_{net} \times \left(1 - \frac{Bact}{B_{max}}\right) \times Bact - Kill\ rate \times Bact \qquad \text{(Eq. 1)}$$

$$Kill\ rate = \frac{Emax \times C^{\gamma}}{EC_{50}{}^{\gamma} + C^{\gamma}} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

Où Bact représente la concentration de bactéries (UFC/mL), K_{net} leur constante de vitesse de croissance (h^{-1}), B_{max} le nombre de bactéries maximum (UFC/mL). Le kill rate (h^{-1}) représente la constante apparente de vitesse de bactéricidie, qui évolue en fonction de la concentration d'antibiotique selon une relation sigmoïde (Equation 2), dans laquelle Emax représente la constante de vitesse maximale de bactéricidie de l'antibiotique (h^{-1}), EC_{50} la concentration nécessaire pour atteindre 50% de l'Emax (mg/L), C la concentration en antibiotique (mg/L) et y le coefficient de Hill.

L'effet inoculum peut alors être évalué par un changement de valeur d'un ou de plusieurs de ces paramètres en fonction des changements d'inocula.

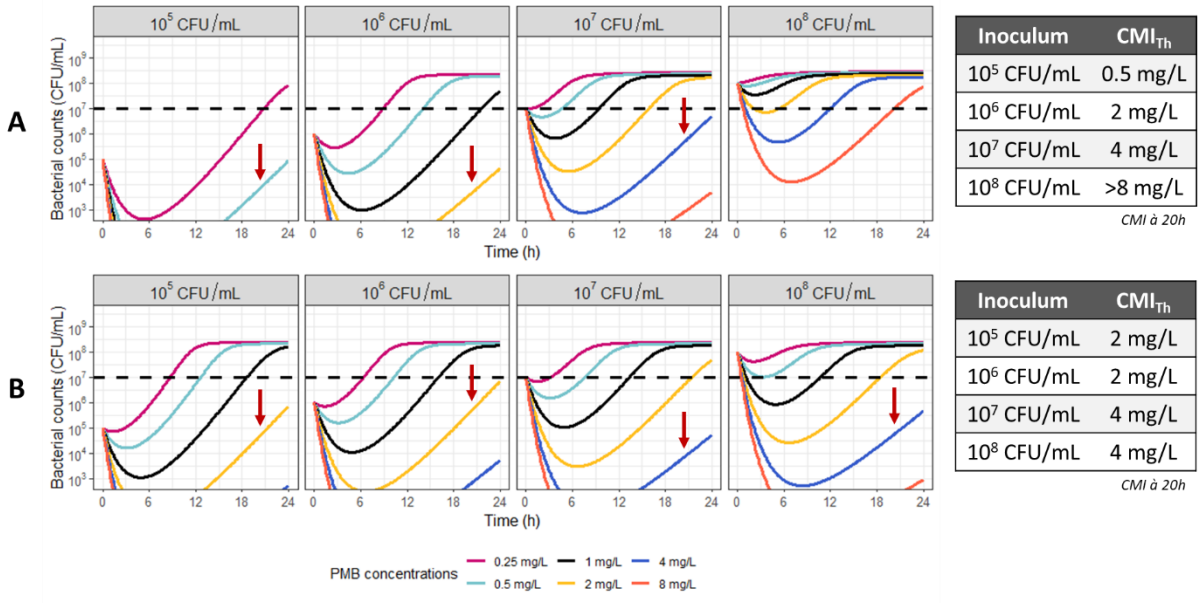
La première étude de cette thèse a d'abord évalué l'effet inoculum par détermination des CMI avec la souche *A. baumannii* CS01, et les résultats ont révélé une augmentation des valeurs

avec la taille de l'inoculum, de <0.125 à 1 mg/L entre 10^5 et 10^8 UCF/mL. Cet effet a ensuite été étudié avec des expériences de TK qui ont mis en évidence une évolution bi-phasique dans le temps du nombre d'UFC, avec une décroissance initiale suivie d'une repousse. Ce comportement bi-phasique a été modélisé avec un modèle d'adaptation qui a révélé que la taille de l'inoculum de départ influençait l'EC_{50} (Equation 3), avec une multiplication par 17 de celui-ci entre les inocula de 10^5 et 10^8 UCF/mL. L'augmentation de l'EC_{50} correspondant à une diminution de la puissance de la PMB, des concentrations supérieures de PMB sont donc nécessaires pour obtenir une même vitesse de bactéricidie quand l'inoculum augmente.

$$\frac{d(Bact)}{d(t)} = k_{net} \times \left(1 - \frac{Bact}{B_{max}}\right) \times Bact - \frac{\left(E_{max(0)} \times \left(1\text{-}K_{adapt} \times AR_{on}\right)\right) \times C^{\gamma}}{EC_{50,med} \times \left(\frac{Starting\ inoculum}{6.5}\right)^{\beta} + C^{\gamma}} \times Bact \quad \text{(Eq. 3)}$$

Où $E_{max(0)}$ correspond à la valeur initial de l'Emax avant le développement de l'adaptation (h^{-1}), K_{adapt} le paramètre décrivant l'impact de la résistance adaptative sur l'effet antibactérien de la PMB, ARon le pourcentage de bactéries adaptées, $EC_{50,med}$ est l'EC_{50} pour une TK avec un inoculum de départ théorique de $10^{6.5}$ UFC/mL et β le coefficient décrivant l'effet inoculum sur l'EC_{50}.

Les courbes présentées sur le panel A de la figure suivante (Figure 30), illustrent l'impact de l'effet inoculum sur les UFC/mL au cours du temps, obtenues avec l'Equation 3. Cet effet est particulièrement visible pour une concentration de PMB égale à 0.5 mg/L, qui se traduit par une rapide décroissance bactérienne durant les premières heures, suivie d'une repousse apparente visible après 16h avec le plus faible inoculum (10^5 UFC/mL), alors que pratiquement aucun effet n'est observé avec le plus fort inoculum (10^8 UFC/mL). Par comparaison les simulations réalisées en absence d'effet inoculum (Figure 30 – panel B), c'est-à-dire avec l'EC_{50} qui est constant pour les différents inocula, montrent également des différences dans les courbes en fonction des différents inocula de départ. Toutefois, ces différences sont moins importantes que dans le cas précédent. Cette dernière observation illustre le fait que la taille de l'inoculum de départ influe sur les valeurs d'UFC/mL à 20h, biaisant les comparaisons ; mais renforcent l'intérêt de la modélisation qui a démontré que l'effet inoculum observé dans les données expérimentales correspond bien à une diminution de l'activité bactéricide de PMB lorsque l'inoculum augmente, attestée par une augmentation d'un facteur 17 de l'EC_{50} entre les inocula de 10^5 à 10^8 UCF/mL.



Inoculum	CMI_{Th}
10^5 CFU/mL	0.5 mg/L
10^6 CFU/mL	2 mg/L
10^7 CFU/mL	4 mg/L
10^8 CFU/mL	>8 mg/L

CMI à 20h

Inoculum	CMI_{Th}
10^5 CFU/mL	2 mg/L
10^6 CFU/mL	2 mg/L
10^7 CFU/mL	4 mg/L
10^8 CFU/mL	4 mg/L

CMI à 20h

Figure 30: *Simulation de la variation des UFC avec le temps pour différentes concentrations de PMB, en fonction de la taille de l'inoculum.*
Le panel du haut tient compte de l'effet inoculum observé sur l'EC_{50} de la PMB, contrairement au panel du bas pour lequel l'EC_{50} a été fixé pour tous les inocula. La CMI_{Th} présentée correspond à la CMI « théorique » déterminée comme la plus petite concentration pour laquelle la concentration bactérienne est < 10^7 UFC/mL à 20h.

Si l'on s'intéresse aux valeurs de CMI, on retrouve dans le panel A comme dans les données observées, une augmentation de la CMI_{Th} (déterminée à partir des courbes des UFC comme la plus faible concentration pour laquelle les UFC/mL sont <10^7 à 20h), bien que ce soit des valeurs différentes. En revanche, dans le panel B, pour lequel les simulations ont été réalisées sans tenir compte de l'effet inoculum sur l'EC_{50}, on observe aussi une augmentation de la CMI_{Th}, toutefois celle-ci n'est que d'un facteur 2, qui serait par ailleurs probablement indétectable en pratique.

Finalement, la modélisation a permis de décrire de manière plus fine l'effet inoculum observé tant en CMI que dans les expériences de TK, et de voir que celui-ci n'était pas seulement dû au changement de la taille de l'inoculum de départ mais bien à une diminution de l'effet de l'antibiotique.

1.2. Modélisation PD de l'effet de la concentration en nutriments des milieux de culture

La seconde étude de ce travail de thèse a ensuite été orientée sur l'influence de la forte concentration en nutriments du bouillon Mueller-Hinton, milieu traditionnellement utilisé dans les tests microbiologiques pour l'évaluation de l'activité des antibiotiques.

En évaluant l'effet de la dilution du milieu à partir des mesures de CMI, les résultats ont montré pour 3 souches d'*A. baumannii* (ATCC 19606, AB121-D0 et AB122-D12) que celle-ci induisait une augmentation de la CMI (facteur 4) entre le CAMHB-100% et 10% pour les souches ATCC 19606 et AB121-D0, et au contraire une diminution d'un facteur 64 de la CMI pour AB122-D12 (Table 1).

Table 1: *Valeurs de CMI [mg/L] pour différentes dilutions de CAMHB (adaptée de la Table 1 – Article 2)*

	ATCC 19606	AB121-D0	AB122-D12
CAMHB-100%	0.25	0.5	128
CAMHB-50%	0.25	0.5	64
CAMHB-25%	0.5	1	16
CAMHB-10%	1	2	2

La modélisation avec un modèle à hétéro-résistance (S/R), des données de TK obtenues avec les différentes dilutions de CAMHB a d'abord permis de mettre en évidence que la dilution du CAMHB n'influençait pas la croissance bactérienne en absence d'antibiotique, contrairement à ce qui pouvait être attendu. La forte concentration en nutriments, bien que choisie pour favoriser la pousse bactérienne en laboratoire, ne semble donc pas remplir ce rôle pour *A. baumannii*. En revanche, la dilution du milieu a eu un effet sur l'activité de la PMB.

Comme lors de la détermination des CMI, la modélisation des données de TK a abouti à des résultats comparables pour ATCC 19606 et AB121-D0 et en revanche, un comportement distinct pour la souche AB122-D12 (Table 2 ci-dessous). Pour les deux premières souches, aucun effet de la dilution n'a été observé pour les sous-populations S, mais dans le cas de l'ATCC 19606, l'$Emax_R$ était augmenté d'un facteur ~2 entre le CAMHB-100% et 10%, tandis que dans celui de l'AB121-D0, l'$Emax_R$ était augmenté d'environ 50 % mais aussi l'EC_{50R} d'un

facteur ~4 (Table 2). Pour AB122-D12, les valeurs d'$Emax_R$ n'ont pas été modifiées par la dilution, mais un effet a été observé sur l'EC_{50}. Et s'il n'a pas été possible de distinguer des valeurs distinctes d'EC_{50} pour S et R, l'EC_{50} commun aux deux sous-populations S et R a été considérablement diminué, par un facteur 50 environ.

Table 2: *Paramètres des modèles PK/PD influencés par la dilution du CAMHB (adaptée de la Table S1 – Article 2)*

		CAMHB-100%	CAMHB-50%	CAMHB-25%	CAMHB-10%
ATCC 19606	$Emax_R$	1.54	1.97	2.46	3.31
AB121-D0	$Emax_R$	1.87	2.11	2.71	3.04
	EC_{50R}	0.425	0.419	1.5	1.6
AB122-D12	EC_{50}	60.4	13.4	3.73	1.13

La dilution du milieu affecte donc différemment l'activité de la PMB selon les souches, ce qui complique la comparaison de cet effet entre les souches. Cependant, pour toutes les souches, la constante de vitesse de bactéricidie évoluant en fonction de la concentration d'antibiotique selon une relation sigmoïde (Equation 2) et étant calculée à partir des estimations de paramètres spécifiques à chaque dilution (Table 2), augmentait avec la dilution du milieu pour les sous-populations R. Cet effet commun pour les trois souches d'*A. baumannii,* s'est traduit par une diminution des repousses bactériennes habituellement observées en TK après la décroissance initiale (Figure 31). Cet effet est d'ailleurs plus prononcé pour AB122-D12 comme l'a décrit le modèle, comparé à l'ATCC 19606 et à la AB121-D0.

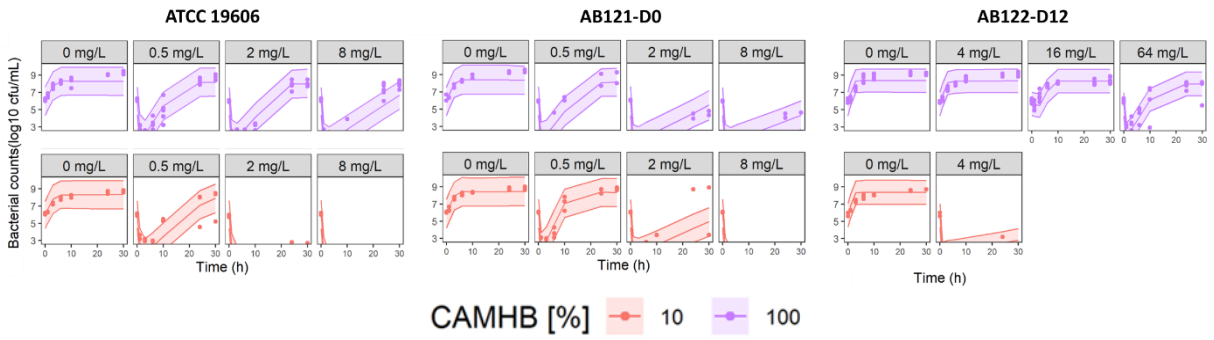


Figure 31: *Visual Predictive Check (VPC) des modèles de l'article 2 pour le CAMHB-100% et 10% et différentes concentrations de PMB.*
Les cercles représentent les données expérimentales, les lignes pleines représentent la médiane des données simulées et les zones colorées représentent l'intervalle de prédiction de 90 % pour 1 000 profils simulés.

Ainsi la modélisation a montré que l'effet de la dilution portait sur l'activité de la PMB, et non sur la croissance des bactéries, pour des raisons qui demeurent inconnues.

Il nous a néanmoins paru intéressant de simuler l'effet d'une modification de la croissance bactérienne sur l'évolution des UFC au cours du temps, puis de comparer ces profils simulés avec ceux observés expérimentalement après une dilution du CAMHB au dixième. Pour cela, les modèles PK/PD finaux, développés dans l'article 2 pour l'ATCC 19606 et AB122-D12, ont été utilisés pour simuler les UFC attendus au cours du temps suite à une diminution de la constante de vitesse de croissance (K_{net}), tandis que les autres paramètres PD étaient fixés aux valeurs estimées à partir des données expérimentales obtenues avec le CAMHB-100%. Ces simulations n'ont pas été réalisées pour la souche AB121-D0, montrant un comportement similaire à l'ATCC 19606, malgré une plus grande variabilité associée. Les simulations montrent que pour l'ATCC 19606, un effet sur les repousses, comparable à celui observé expérimentalement après dilution au 1/10 du CAMHB, aurait pu être observé suite à une réduction d'environ 50% du K_{net} (de 1.47 à 0.77 h^{-1}) (Figure 32), ce qui aurait pu être caractérisé par la modélisation.

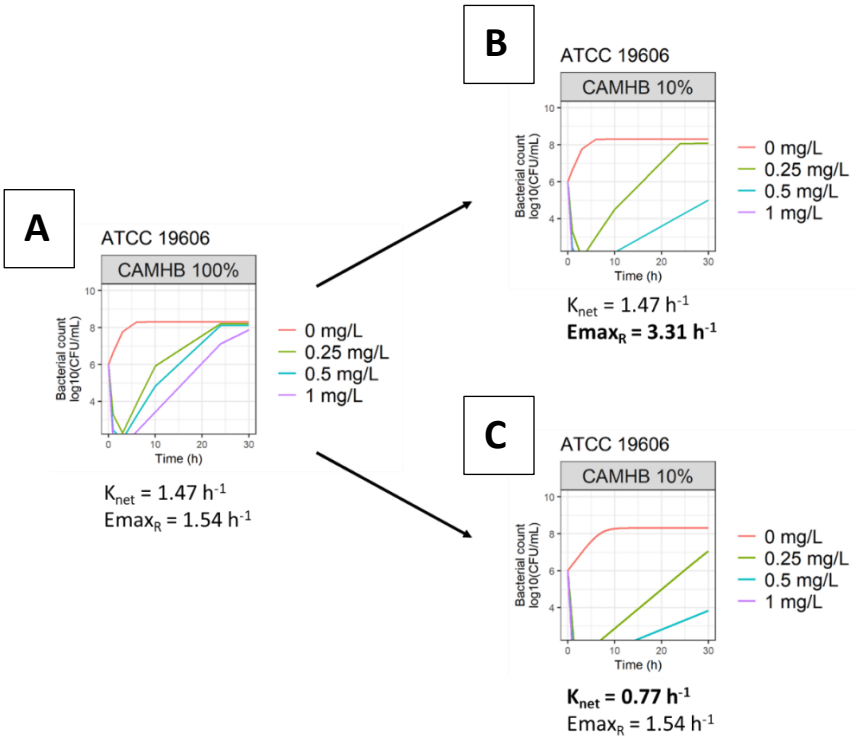


Figure 32: *Simulations pour ATCC 19606 de l'évolution des valeurs d'UFC en fonction du temps pour différentes concentrations de PMB.*
***A** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100%. **B** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100% avec un $Emax_R$ augmenté d'un facteur ~2. **C** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100% avec un K_{net} diminué d'un facteur ~2.*

En revanche, un résultat différent a été obtenu avec AB122-D12. En diminuant le K_{net}, les courbes « s'aplatissent » sans jamais retrouver le profil obtenu expérimentalement après une dilution d'un facteur 10 du CAMHB (Figure 33). Pour cette souche par ailleurs, un effet de la dilution du milieu plus important que pour l'ATCC 19606 et AB121-D0 avait été observé, ainsi qu'un effet sur les deux sous-populations S et R.

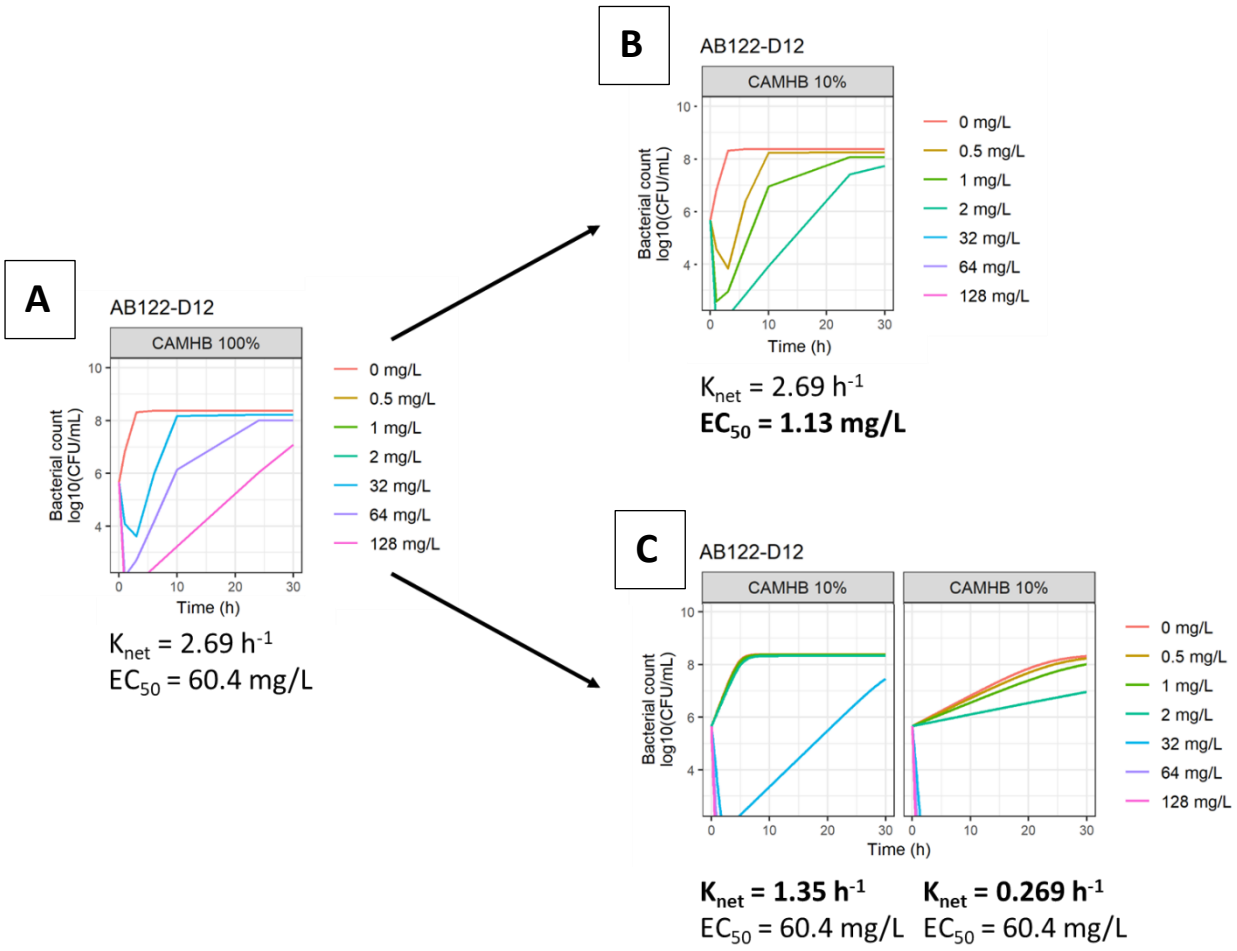


Figure 33: *Simulations pour AB122-D12 de l'évolution des valeurs d'UFC en fonction du temps pour différentes concentrations de PMB.*
***A** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100%. **B** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100% avec un EC_{50} diminué d'un facteur ~53. **C** : Simulations réalisées avec les paramètres du modèle PD dans le CAMHB-100% avec un K_{net} diminué d'un facteur 2 et 10.*

L'inspection visuelle des données de TK montrait que la dilution du milieu était responsable de la diminution des repousses apparentes pour les 3 souches d'*A. baumannii*, ce qui était contraire aux variations de CMI observées pour l'ATCC 19606 et AB121-D0. Toutefois les CMI et les TK seuls n'indiquaient pas si l'effet observé résultait d'un effet sur la croissance

bactérienne ou sur l'activité de la PMB. Ces simulations montrent que pour l'ATCC 19606, une diminution de la croissance aurait pu effectivement avoir un effet virtuellement comparable à celui observé expérimentalement, mais celui-ci a été modélisé par une augmentation de l'activité de la PMB. Par conséquent, la modélisation a permis de discriminer ces deux effets potentiels. En revanche, pour AB122-D12, la modélisation suggère qu'un effet sur le K_{net} n'aurait pas permis d'observer les effets sur les TK, comparables à ceux observés par la modification de l'activité de PMB. Cette variabilité entre les souches, observée dans cette étude sur l'impact des dilutions du milieu, reste toutefois sans explication évidente.

1.3. Modélisation PD de l'effet de la mucine

Dans la troisième étude, de la mucine, principal composant du mucus, a été rajoutée dans le milieu de culture seulement pour les souches AB121-D0 et AB122-D12. Les résultats de mesure des CMI montrent des augmentations de facteurs 32 et 64 respectivement pour AB121-D0 et AB122-D12, après l'ajout de 1% de mucine (Table 3). Néanmoins la détermination des CMI a nécessité une méthode de lecture alternative (*i.e.* un ajout d'un indicateur colorimétrique des cellules vivantes: la résasurine) du fait du trouble du milieu déjà induit par la mucine. Toutefois, si un effet de la mucine a pu être mis en évidence par l'augmentation des valeurs de CMI, ce résultat ne permettait pas d'identifier si ce changement de valeurs était seulement dû à la liaison de la PMB à la mucine (357).

La modélisation de la fixation de la PMB à la mucine a permis la détermination de la fraction non liée à la mucine (f_{u_m}) pour des concentrations de PMB comprises entre 5 et 10 000 mg/L. Dans cette large gamme, le f_{u_m} augmente de manière non-linéaire de 6% à 62%. Toutefois pour les concentrations de PMB retrouvées en thérapeutique, jusqu'à 10 mg/L (358), plus de 90 % de la PMB serait liée à la mucine.

Afin d'exprimer les valeurs de CMI pour AB121-D0 et AB122-D12 (64 et 1024 mg/L) en concentrations libres et donc actives, celles-ci ont été multipliées par le f_{u_m} correspondant, c'est-à-dire respectivement ~20% et ~60%, pour obtenir des valeurs de $CMI_{unbound}$ (CMI non liée) égales à 13 et 628 mg/L (Table 3). Ainsi, pour AB121-D0, le rapport entre les valeurs de CMI exprimées en concentration totale et en concentration libre est de 5 (64/13), ce même

rapport est égal à 1.6 pour AB122-D12 (1024/628). Ces différences reflètent la fixation non-linéaire et saturable de la PMB sur la mucine.

Table 3: *Valeur de CMI pour différents milieux [mg/L] (Table 2 – Article 3)*

CMI [mg/L]	*CAMHB*	*CAMHB + 1% mucine*	*CAMHB + 1% mucine (corrigée par le fu)*
AB121-D0	1	64	13
AB122-D12	32	1024	628

En revanche, le rapport des valeurs (en concentration libre) de CMI mesurées dans le CAMHB et corrigées par le $f u_m$ en présence de mucine reste de 13 (13/1) pour AB121-D0 et 20 (628/32) pour AB122-D12, suggérant un effet propre de la mucine réduisant l'effet de la PMB en plus de la liaison, sans toutefois plus d'information (Table 3).

La modélisation PK/PD des données de TK avec et sans mucine pour lesquelles les concentrations de PMB étaient exprimées sous forme libre (après multiplication par le $f u_m$), a permis de confirmer un effet propre de la mucine sur l'action de la PMB, décrit par une augmentation d'un facteur 1.4 de l'$Emax_R$ d'AB121-D0, et par une augmentation d'un facteur 5 de l'EC_{50} d'AB122-D12. De plus, la modélisation a également permis de montrer un effet de la mucine sur la vitesse de croissance d'AB122-D12 par une réduction d'un facteur ~2 de celle-ci. Cet effet propre est visible sur les VPCs (Figure 34) qui montrent pour AB121-D0, pour des concentrations libres de PMB de ~1 et 4 mg/L, des repousses en absence de mucine qui ne sont plus apparentes lorsque celle-ci a été ajoutée. Alors que pour AB122-D12, aucune repousse n'est observée à partir de 256 mg/L en CAMHB, alors qu'elles sont visibles jusqu'au moins 304 mg/L en présence de mucine. L'explication de cette variabilité entre les souches reste toutefois à déterminer.

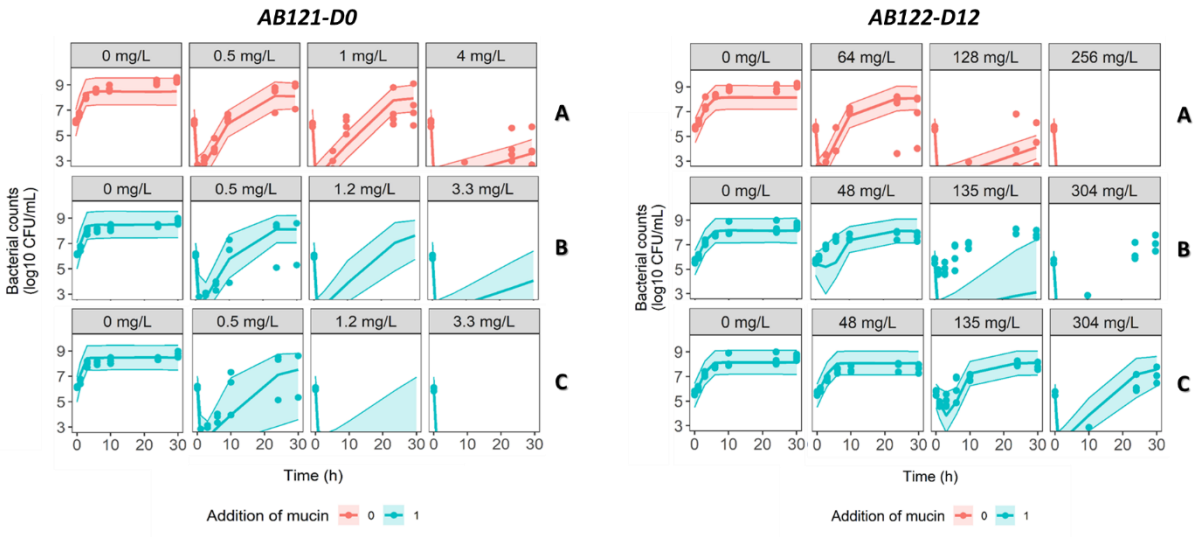


Figure 34 : *Visual Predictive Check (VPC) des modèles de l'article 3 pour AB121-D0 et AB122-D12. Les cercles représentent les données expérimentales, les lignes pleines représentent la médiane des données simulées et les zones colorées représentent l'intervalle de prédiction de 90 % pour 1 000 profils simulés. Les panels **A** représentent les données sans mucine, les **B** représentent les données avec mucine en ne prenant en compte que la correction des concentrations totales de PMB avec le fu_m et aucun effet mucine supplémentaire. Les panels **C** représentent les données avec mucine et avec la correction avec le fu_m et l'effet mucine sur le K_{net} et/ou les paramètres d'effet de la PMB. Les concentrations de PMB indiquées représentent les concentrations de PMB non liées dans les tubes TK.*

Ainsi, cette étude aura montré que la mucine induisait une réduction de l'effet de la PMB avec des valeurs de CMI plus élevées en présence, qu'en absence de mucine, même après multiplication des valeurs par le fu_m. Cet effet n'a pu cependant être confirmé en TK que pour AB122-D12 où la modélisation a permis de quantifier l'effet de la mucine sur la croissance et sur l'activité de la PMB.

L'activité antimicrobienne *in vitro* de la PMB a été caractérisée, lors de cette thèse, à l'aide de modèles PD semi-mécanistiques développés à partir de données obtenues avec des modèles expérimentaux statiques (Time-Kill). Contrairement aux mesures de CMI qui ne reposent que sur un résultat à un temps prédéfini (20h ou 24h), les TK consistent à mesurer l'évolution des CFU dans le temps. Ils permettent d'identifier et de quantifier les variations d'activité de la PMB (courbes biphasiques avec décroissance initiale rapide des CFU en fonction du temps, avant l'observation de repousses). Une des supériorités de la modélisation PD par rapport à l'estimation des CMI provient donc d'abord de données expérimentales plus complètes, et ensuite de la manière dont celles-ci sont analysées. La modélisation permet notamment une quantification plus précise des phénomènes et de pouvoir distinguer les effets de la croissance bactérienne de l'action de l'antibiotique. Mais si l'intérêt de la modélisation PD semi-

mécanistique vient d'être illustré dans ces différents cas de figure, il existe également des limites à cette approche.

2. Limite de la modélisation PD

2.1. Choix de la structure du modèle PD

Les modèles sont sélectionnés par rapport à différents critères : (i) la valeur de la fonction objective et/ou le critère AKAIKE, (ii) la qualité d'ajustement des données, (iii) la plausibilité des estimations des paramètres, (iv) les graphes diagnostiques standards, et (v) la précision d'estimation (359).

Deux types de modèles PD avec des structures différentes ont ainsi été sélectionnés dans cette thèse. Le modèle avec une résistance adaptative pour l'étude de l'effet inoculum et le modèle avec hétéro-résistance (S/R) pour les études de l'effet de la concentration en nutriments dans le CAMHB, et de l'effet de la mucine. Ces deux types de modèles (Figure 35) sont traditionnellement utilisés pour décrire les repousses bactériennes en TK *in vitro* et ont permis une description satisfaisante de nos données expérimentales.

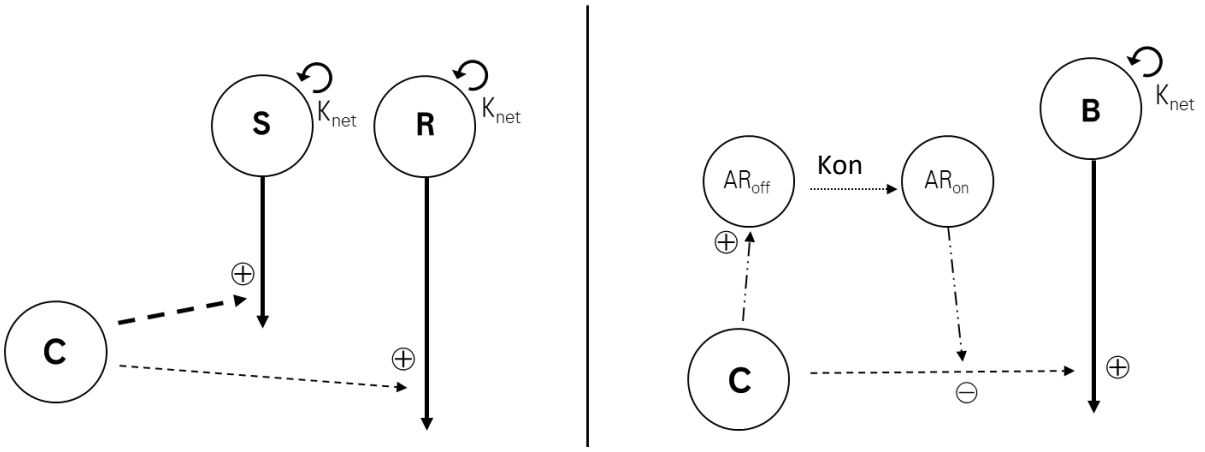


Figure 35: *Représentation graphique des modèles PK/PD avec hétéro-résistance (à gauche) et adaptation (à droite).*
S : compartiment représentant les bactéries sensibles, R : compartiment représentant les bactéries résistantes, B : compartiment représentant les bactéries, AR_{off} et AR_{on} : compartiments représentant le pourcentage de bactéries non adaptées et adaptées respectivement, C : compartiment représentant l'antibiotique à une concentration stable qui promeut la mort bactérienne, Kon : constante de vitesse d'adaptation

Si l'on s'intéresse aux différences d'ajustement des modèles en utilisant l'exemple des données de TK de l'article 3, obtenues dans le CAMHB, on peut s'apercevoir en comparant les valeurs d'AKAIKE (AIC) des deux modèles (Critère (i) de sélection des modèles), que c'est le modèle d'adaptation (AIC=76.6) qui permet un meilleur ajustement des données par rapport au modèle S/R (AIC=79.5). Toutefois, ces deux valeurs sont très proches, et en regardant les VPCs (Critère (ii)), on peut s'apercevoir que les deux structures de modèle décrivent de manière similaire les données de TK sur 30h (Figure 36).

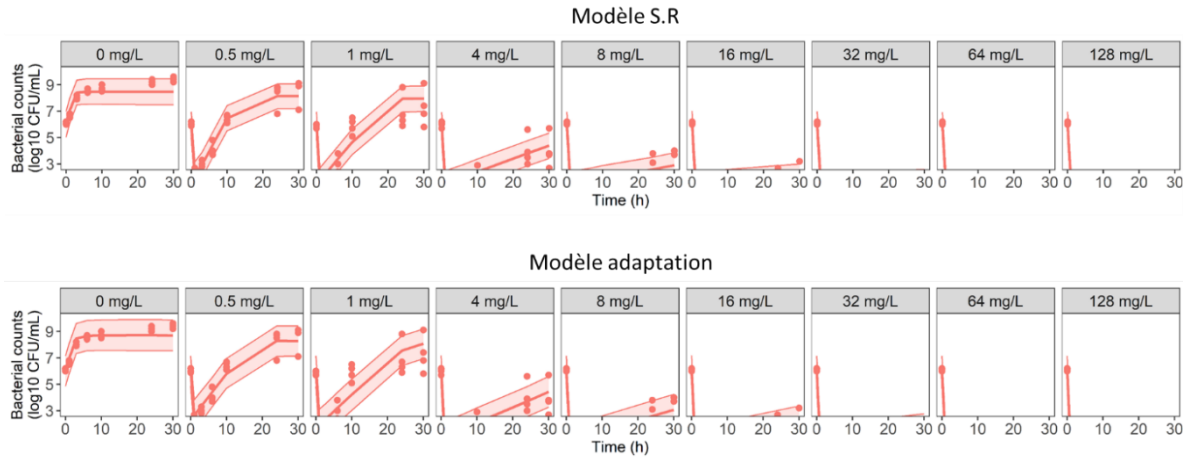


Figure 36: *Visual Predictive Check (VPC) des données de TK pour différentes concentrations de PMB. Les cercles représentent les données expérimentales, les lignes représentent la médiane des données simulées et les zones colorées représentent l'intervalle de prédiction de 90 % pour 1 000 profils simulés.*

En s'intéressant de plus près aux résultats, on observe que pas ou peu de données sont disponibles pendant la phase de décroissance initiale, et que les repousses commencent rapidement après celle-ci (durant les 3 premières heures d'expérience). Ce type d'effet de la PMB sur *A. baumannii* peut être aussi bien décrit par un modèle S/R où la population R devient rapidement majoritaire, que par un modèle d'adaptation avec une constante de vitesse d'adaptation élevée (estimée à 5.22 h^{-1}) qui traduit une adaptation rapide de toutes les bactéries. Ce modèle avec une adaptation rapide devient alors semblable au modèle S/R avec la présence d'une seule population adaptée/résistante très rapidement après l'exposition à l'antibiotique, comme le représente la Figure 37 ci-dessous.

Cette figure (Figure 37) qui montre les proportions des sous-populations S, R et de bactéries adaptées simulées pour AB121-D0 et pour la concentration équivalente à sa CMI, décrit que

pour les deux types de modèles toutes les bactéries sont résistantes ou adaptées après 1h d'expérience.

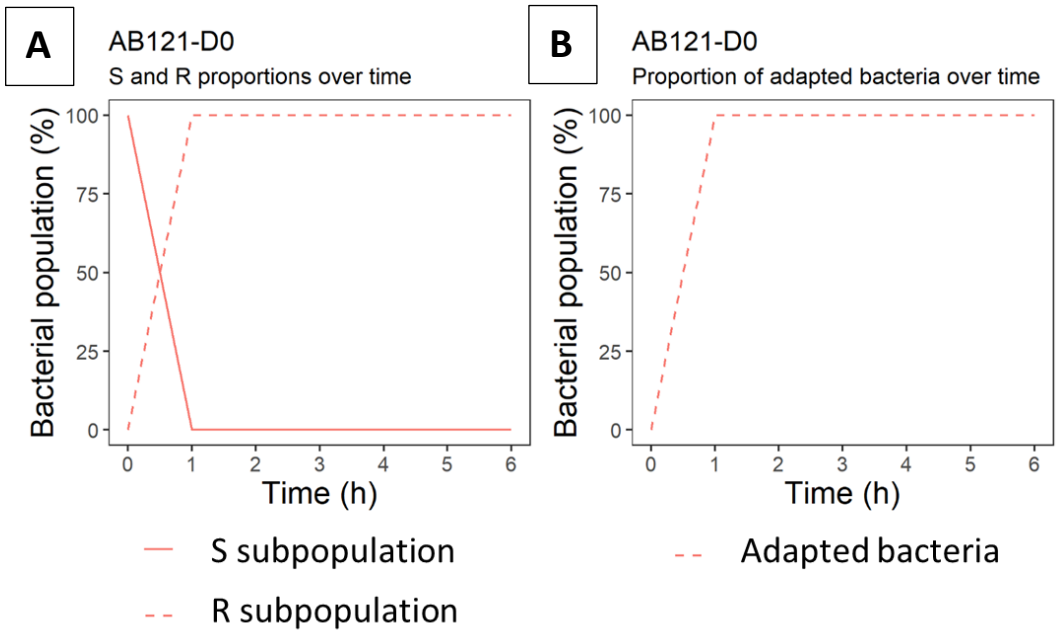


Figure 37: *Evolution dans le temps de la proportion des bactéries dans les modèles S/R et d'adaptation. En (**A**) proportion des bactéries sensibles (S) et résistantes (R) dans le modèle à 2 sous-population et en (**B**) proportion de bactéries adaptées dans le modèle d'adaptation. Simulations réalisées pour AB121-D0 et une concentration en PMB de 1 mg/L (CMI de la souche).*

De plus, étant donné que les paramètres du modèle d'adaptation étaient moins bien estimés que ceux du modèle S/R, avec des RSE (*relative standard error*) plus élevés, c'est donc le modèle S/R qui a été utilisé pour modéliser les données de TK des articles 2 et 3.

En l'absence d'informations mécanistiques précises, les modèles PD S/R démontrent le plus souvent une supériorité sur les modèles reposant sur des phénomènes d'adaptation (360). Toutefois, des expériences de plus longue durée pourraient permettre de mieux discriminer ces deux types de modèles. Par exemple, la réalisation de TK séquentielles a été proposée (361). Les modèles S/R suggèrent pratiquement toujours que les formes S sont rapidement détruites et ont totalement disparu en 24h-30h, fin habituelle des expériences de TK. Ainsi considérant que seules des bactéries R seraient présentes à la fin de la 1ère TK, une 2nd TK réalisée à partir de cette population homogène de bactéries R, ne devrait plus présenter l'allure bi-phasique correspondant à la disparition initiale de la sous-population S et à

l'apparition des R. En revanche dans le cas d'une adaptation relativement lente mais soutenue dans le temps, l'aspect bi-phasique devrait être retrouvé lors de la 2nd TK réalisée entre les temps 24h et 48h (Figure 38).

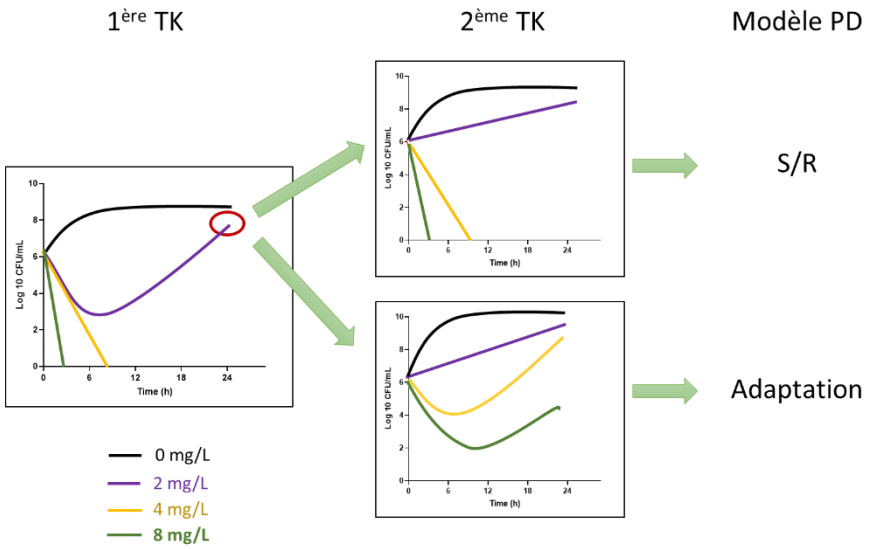


Figure 38: *Représentation des profils de courbes de TK obtenues lors de TK séquentielles, pour le choix de la structure des modèles PD.*

Les TK séquentielles sont une méthode intermédiaire entre les TK et les HFIM qui sont plus compliqués à mettre en œuvre, mais restent les seuls capables de caractériser *in vitro* des modifications PD apparaissant plus tardivement (362, 363), comme cela peut se produire *in vivo* avec l'apparition de mutations survenant après plusieurs jours de traitement. De plus, la reproduction de profils PK en HFIM pourrait permettre de voir des différences par rapport en TK sur les temps précoces.

2.2. Apport des données mécanistiques dans la modélisation PD

L'approche par modélisation PD semi-mécanistique *in vitro* décrite dans ce travail permet de précisément quantifier des modifications d'activité apparente des antibiotiques dans diverses circonstances et de préciser leur origine, par exemple modification de la repousse par modification de l'activité antibiotique, ou même parfois et au contraire, effet sur la croissance spontanée de la bactérie sans modification de l'activité antibiotique. Mais cette approche ne permet pas d'expliquer les mécanismes biologiques. Comme pour l'exemple des repousses

qui peuvent être décrites par le développement d'une sous-population bactérienne résistante ou par des phénomènes d'adaptation, sans qu'il ne soit possible de le vérifier. De même, les différences de comportement observées entre les souches ATCC 19606 et AB121-D0 d'une part et AB122-D12 d'autre part, restent inexpliquées ce qui pénalise la généralisation des observations à d'autres souches. Il existe de ce fait un besoin croissant d'informations plus mécanistiques afin de mieux caractériser les données *in vitro* et d'enrichir la modélisation.

Le modèle semi-mécanistique PK/PD avec hétéro-résistance (S/R) utilisé dans cette thèse pour les articles 2 et 3, considère deux sous-populations homogènes : avec initialement une majorité de bactéries sensibles (S) conduisant à la diminution initiale des CFU observées lors des expériences TK, puis des bactéries résistantes (R) se développant pour devenir dominantes avec le temps et responsables de la repousse bactérienne. Il serait donc intéressant de chercher à caractériser les mécanismes de résistance de cette sous-population R.

Dans un premier temps, la présence de sous-populations hétéro-résistantes vis-à-vis de la PMB a pu être évaluée par des tests de PAPs. Les résultats (*non présentés dans la thèse)* indiquaient pour AB121-D0, la présence d'une sous-population préexistante avec une fréquence de mutation de ~5.10^{-8} pour des concentrations à 8xCMI, alors qu'AB122-D12 ne montrait pas de sous-populations préexistantes quantifiables à 8xCMI. Les expériences de PAPs montrent que les deux souches ne présentent probablement pas de sous-populations résistantes dans les inocula de départ des TK (1.10^6 UFC/mL).

Dans un deuxième temps, les sous-populations R peuvent être caractérisées avec l'identification d'une mutation induisant une résistance à la PMB. L'analyse des données de séquençage réalisée sur les échantillons bactériens prélevés à la fin des expériences de TK (Article 3) a parfois pu mettre en évidence le développement de mutants résistants à la PMB. Pour AB121-D0, des mutations dans l'opéron *pmrABC* ont été observées pour 9 échantillons sur 26 (35 %). Pour AB122-D12, des modifications de l'opéron *lpxACD* ont été observées en plus de la mutation pré-existante dans *pmrB*, pour 6 échantillons sur 44 (14 %).

Ainsi, il reste 17 échantillons sur 26 pour AB121-D0, et 38 sur 44 pour AB122-D12 pour lesquels les repousses en TK restent inexpliquées. Parmi ces échantillons, seulement 2 pour AB121-D0 et 3 pour AB122-D12 montraient une élévation de leur valeur de CMI par rapport aux

contrôles. Ces échantillons pour lesquels aucune mutation n'a été retrouvée, laissent supposer la présence d'un ou d'autre(s) mécanisme(s) de résistance comme de l'adaptation.

Alors que le modèle S/R avait été retenu pour la modélisation de l'ensemble des données de TK pour AB121-D0 en CAMHB, ces données ont été remodélisées en distinguant les réplicas pour lesquels une mutation conférant une résistance à la PMB a été identifié (Groupe 1) et les réplicas pour lesquels aucune mutation n'a été observée (Groupe 2). Les VPC présentés dans la Figure ci-après (Figure 39) montrent que les modèles S/R et adaptation décrivent de manière similaire les données des deux groupes, bien que le score d'AKAIKE soit inférieur pour le modèle S/R comparé au modèle d'adaptation pour le groupe 1 (AIC = -21.3 versus 3.4 pour le modèle adaptation), et quasiment équivalent pour le groupe 2 (AIC = 53.3 pour le S/R versus 54.7 pour le modèle d'adaptation).

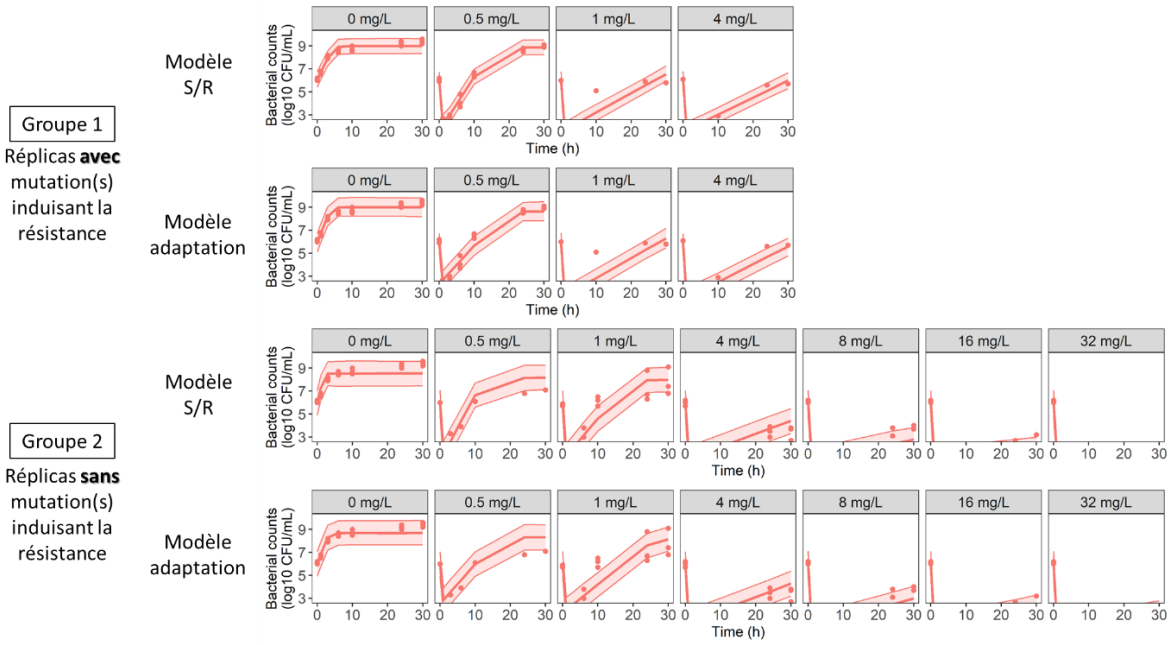


Figure 39: *Visual Predictive Check (VPC) des données de TK.*
Les cercles représentent les données expérimentales, les lignes représentent la médiane des données simulées et les zones colorées représentent l'intervalle de prédiction de 90 % pour 1 000 profils simulés.

Par conséquent, le modèle S/R ne permet pas une meilleure caractérisation des données lorsque des mutations sont identifiées, et inversement, l'utilisation d'un modèle d'adaptation n'améliore pas l'ajustement des données lorsqu'une sous-population R n'est pas identifiée.

Ces modèles semi-mécanistiques sont très utiles pour décrire les évolutions biphasiques des CFU dans le temps, très souvent observées lors d'expériences de TK *in vitro* avec les bactéries à Gram négatif (364, 129, 365), mais ils restent une simplification de la réalité sans doute bien plus complexe. Ainsi les interprétations mécanistiques qui pourraient en découler doivent rester prudentes.

Après la recherche de mutants afin d'apporter un support mécanistique au modèle S/R, des changements d'expression de gènes pouvant constituer un support au modèle d'adaptation, ont été recherchés. L'analyse des données de transcriptomique a montré que les souches AB121-D0 et AB122-D12 développaient des mécanismes d'adaptation. En effet la souche AB121-D0 semble présenter un possible remodelage de sa membrane en réponse à la présence de PMB (Figure 40). Et la souche AB122-D12 montre bien des changements d'expression de différents gènes en présence d'antibiotique, toutefois l'établissement de leur rôle avec un possible mécanisme d'adaptation par rapport à la PMB nécessite davantage de recherche.

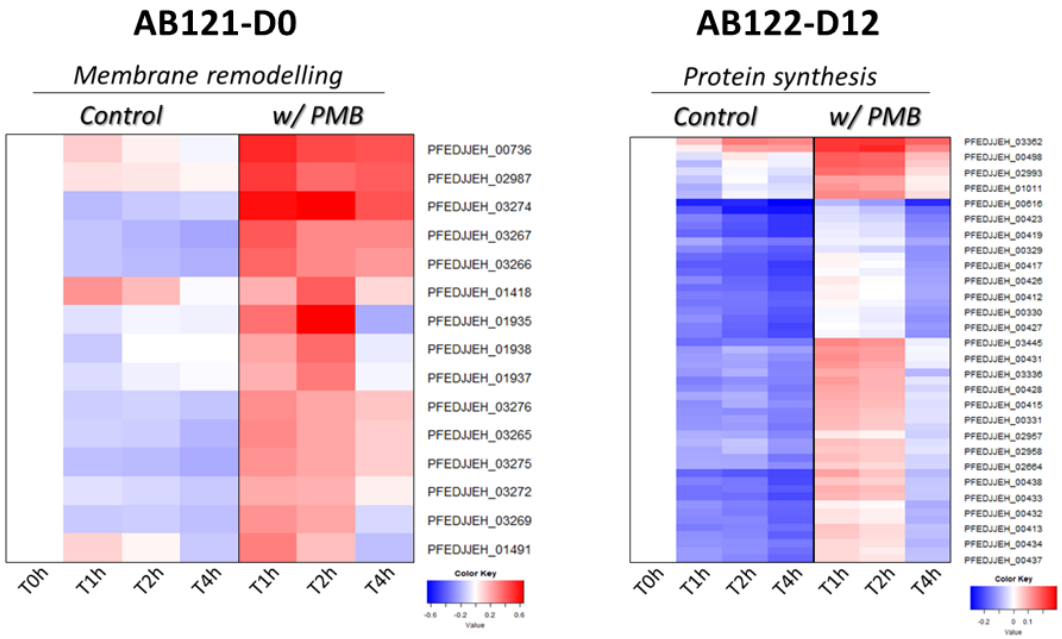


Figure 40: *Cartes thermiques des expressions géniques.*
Les données ont été normalisées sur la valeur expérimentale T0h. « w/ PMB » correspondait à la condition avec PMB et « Control » sans.

Par ailleurs, en plus des variations d'expression de gènes, il existe aussi d'autres mécanismes d'adaptation qui n'ont pas été évalués dans cette thèse comme les modifications

épigénétiques. Ces modifications épigénétiques confèrent une identité unique au matériel génétique des bactéries et régulent son activité transcriptionnelle et son expression protéique (366–369). Toutefois, l'identification de ces mécanismes reste encore difficile bien que le développement de nouvelles technologies comme le séquençage de troisième génération va permettre de les étudier plus en profondeur.

Pour compléter l'analyse phénotypique de l'interaction de la PMB avec les souches AB121-D0 et AB122-D12, des expériences de TK avec de la PMB-rhodamine ont été suivies en microscopie confocale. Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence de sous populations pour la souche AB122-D12 ne fixant pas la PMB à sa membrane, contrairement à la souche AB121-D0 où toutes les cellules fixaient l'antibiotique (Figure 41). La sous-population ne fixant pas la PMB, observée pour AB122-D12 n'a pas été préférentiellement sélectionnée par le traitement avec la PMB durant les expériences de TK.

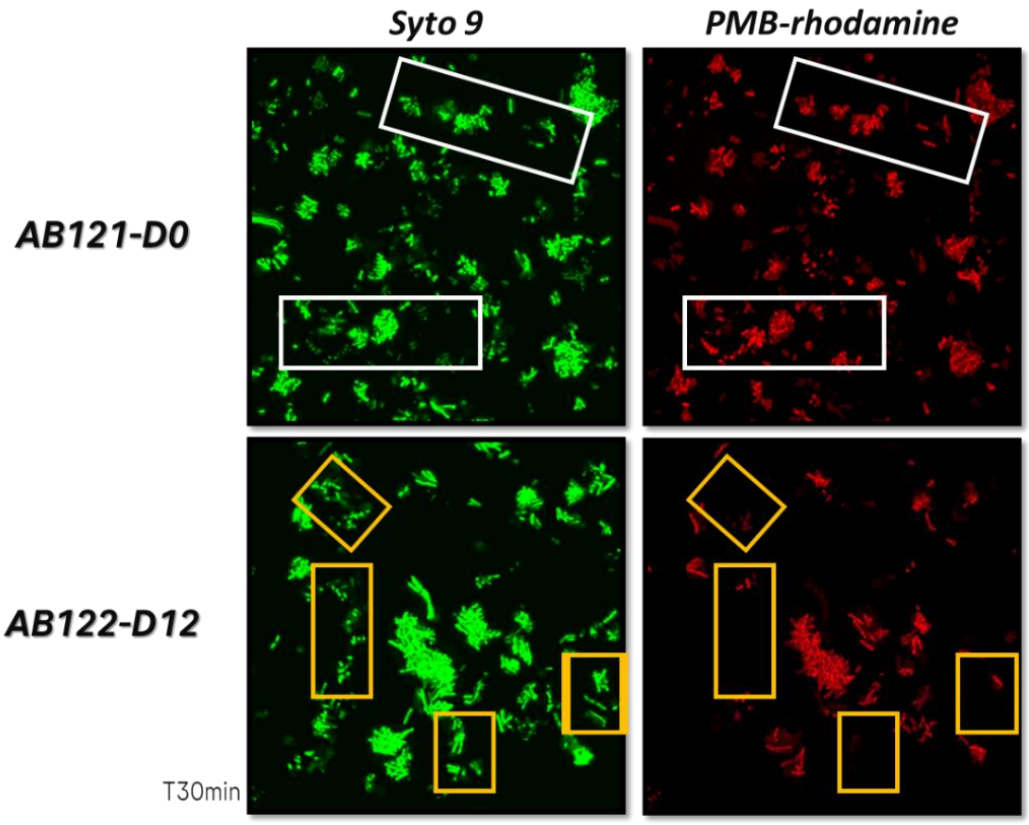


Figure 41: *Images obtenues au microscope confocale.*
Toutes les bactéries sont marquées en vert par le marqueur Syto 9 et la PMB-rhodamine est en rouge. Figure adaptée de la Figure 5 de l'Article 4. Les rectangles blancs indiquent les bactéries fixant la PMB-rhodamine et les jaunes montrent les bactéries sans PMB-rhodamine sur leurs membranes.

Par conséquent, les deux souches qui présentaient des profils d'UFC en fonction du temps similaires avec des décroissances initiales suivies de repousses, montrent des mécanismes de résistance différents. Pour AB121-D0, les repousses pourraient être expliquées par le développement d'une population présentant une mutation dans l'opéron *pmrABC* et/ou par l'adaptation de la souche à l'action de la PMB par le remodelage de sa membrane. En ce qui concerne AB122-D12, les repousses pourraient être dues à la présence de populations mutées dans les gènes *lpxACD*, ou au développement de la sous-population ne fixant pas la PMB à sa membrane, ou encore à la surexpression d'un gène qui reste à identifier. Par ailleurs, les mécanismes étudiés dans ce travail de recherche ne sont pas exhaustifs, et par conséquent d'autres mécanismes non identifiés ici pourraient aussi être responsables des repousses observées lors des expériences de TK.

Ainsi, les expériences de séquençage et de transcriptomique apportent des informations nombreuses mais qui ne permettent pas de choisir entre un modèle avec deux sous-populations hétérogènes S/R et un modèle homogène avec une seule population bactérienne qui s'adapte dans le temps au contact de l'antibiotique. En effet, un mécanisme peut être mis en place préférentiellement par les bactéries selon des conditions ou les réplicas d'expérience. De plus, ces mécanismes peuvent également être combinés tous au long d'une expérience ou se succéder (par exemple : la bactérie pourrait d'abord présenter des mécanismes d'adaptation avant le développement d'une sous-population mutée).

Tait *et al.* (130) ont illustré ce phénomène en recherchant la présence de sous-populations de *P. aeruginosa* résistantes au ceftolozane/tazobactam avant et pendant leurs expériences d'HFIM. Ils ont ensuite modélisé leurs données en incluant une structure de modèle S/R pour les réplicas présentant ces sous-populations résistantes à T0h, et une structure d'adaptation pour le réplica qui n'en présentait pas (Figure 42).

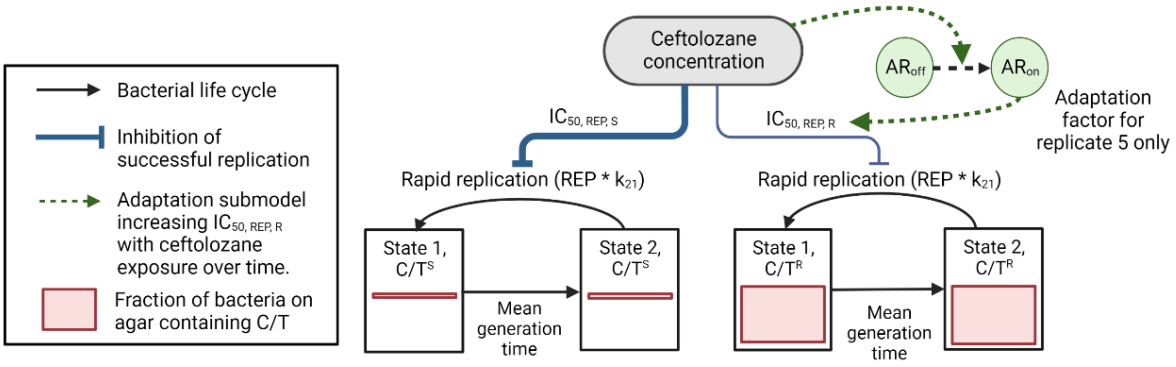


Figure 42: *Représentation schématique du modèle de Tait et al. basé sur des expérience en HFIM avec du ceftolozane/tazobactam (C/T) contre P. aeruginosa et incluant les structures S/R et d'adaptation (130).*

3. Corrélation PK/PD *in vitro / in vivo*

Les divers travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont confirmé l'avantage potentiel de la modélisation PD semi-mécanistique *in vitro* par rapport à l'approche traditionnelle reposant sur les index PK/PD. Il reste toutefois à évaluer la capacité de ces modèles *in vitro* à prédire l'activité des antibiotiques *in vivo*. Et pour cela, il faut pouvoir disposer de données *in vitro* et *in vivo* comparables.

La première difficulté se situe au niveau des concentrations d'antibiotiques, donc dans la partie PK des modèles, sachant que ceux-ci nécessitent de connaître la concentration libre, active, de l'antibiotique au contact des bactéries. Ceci ne pose pas de problème *in vitro*, tant lors des expériences de TK que d'HFIM. Ces concentrations sont choisies par l'expérimentateur et si nécessaires confirmées par des mesures. En revanche, *in vivo*, la connaissance des concentrations libres de l'antibiotique au niveau du site infectieux est plus difficilement accessible. Les mesures de concentrations dans le liquide interstitiel, pertinentes dans le cas fréquent d'infections extracellulaires, comme pour celles causées par *A. baumannii*, peuvent être réalisées par microdialyse tissulaire, tant chez l'homme que chez l'animal (370–372). Toutefois cette technique requiert une réelle expertise et présente des limites. La détermination des PK tissulaires par microdialyse chez le rongeur peut être réalisée dans divers organes tels que le muscle ou le cerveau, chez l'animal vigile infecté ou non, ou seulement chez l'animal anesthésié pour étudier la diffusion d'un antibiotique dans le cerveau, le liquide péritonéal ou encore le poumon. Mais si de nombreuses études de

microdialyse dans le muscle ont été publiées, peu l'ont été dans le poumon, à cause de leurs difficultés de mises en œuvre en particulier chez des animaux fragilisés par l'infection (373). De plus, tous les antibiotiques ne se prêtent pas à des études de microdialyse, ce qui est le cas des polymyxines (PMB ou colistine), à cause de leur adsorption sur les membranes de microdialyse. Une alternative aurait pu consister à déterminer les concentrations de PMB dans le liquide de revêtement de l'épithélium respiratoire (*Epithelial Lining Fluid – ELF*) obtenues par lavage broncho-alvéolaire. Toutefois ceci est relativement délicat chez la souris et de plus, un récent article suggère que les antibiotiques ne sont pas exclusivement sous forme libre dans l'ELF, et se fixent à divers constituants (231).

La pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK) est une approche très prometteuse, quant à sa capacité à prédire des concentrations tissulaires *in silico*, sans avoir à les mesurer (374). La commercialisation de logiciels dédiés tel que PK-Sim® a favorisé le développement de la modélisation PBPK, faisant appel à des modèles complets ou à des modèles réduits, comme celui développé ici pour prédire les concentrations de PMB dans le muscle et le poumon de la souris (Figure 43)

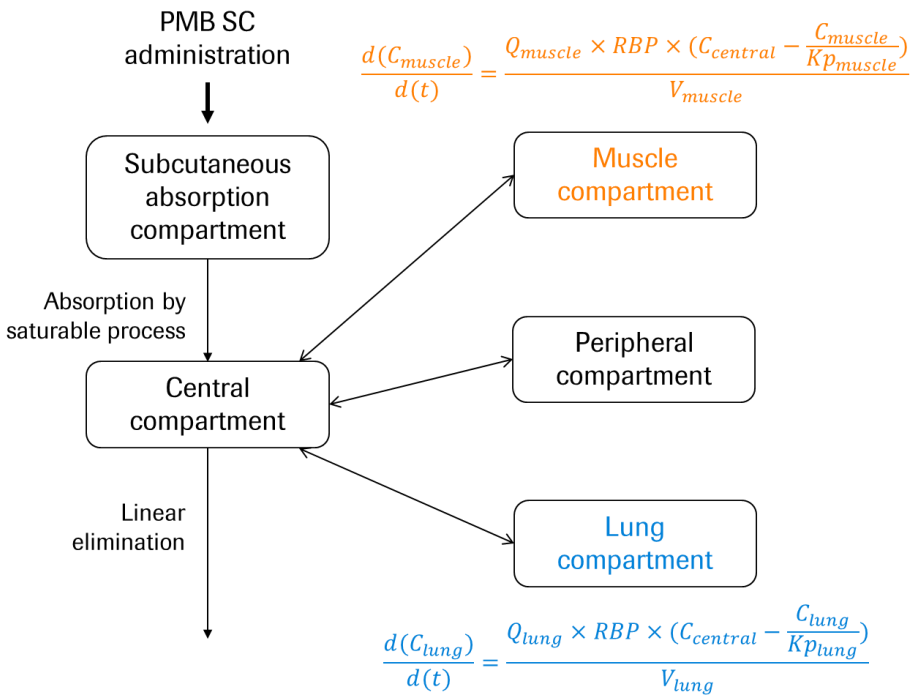


Figure 43: *Représentation du modèle PBPK*
Abréviations : SC : sous-cutané, Q : débit sanguin (L/h/kg), RBP : ratio des concentrations entre le sang et le plasma, C : concentration de PMB (mg/L), Kp : coefficient de partage tissu-plasma, V : volume de l'organe (L/kg)

Ce modèle PBPK a été obtenu en adaptant un modèle PK de la PMB, précédemment développé à partir des concentrations plasmatiques totales et libres chez la souris (154), pour caractériser la distribution de la PMB dans les muscles et les poumons (méthode détaillée en Annexe). Ce modèle a été associé aux modèles PD des articles 2 ou 3, pour simuler l'évolution du nombre de bactéries dans le muscle de la cuisse et le poumon respectivement (étude détaillée en Annexe). Les simulations PK/PD ont ensuite été comparées à des données PD *in vivo* chez la souris, obtenues après infection de la cuisse ou du poumon par la souche AB121-D0. Brièvement, ces données correspondent à l'évolution du nombre de CFU/g_{tissu} en fonction du temps chez des souris neutropéniques, dans un modèle d'infection de la cuisse établi suite à l'injection intramusculaire de 5.10^6 CFU/souris, et dans un modèle d'infection pulmonaire obtenu suite à une injection intratrachéale d'un inoculum de 5.10^6 CFU/souris. Les effets de deux doses uniques (20 et 40mg/kg) et d'une dose répétée (2x40mg/kg à 6 heures d'intervalle) injectées par voie sous-cutanée 2h après l'inoculation bactérienne, ont ensuite été évalués par des prélèvements successifs jusqu'à T26h (soit 24h après l'injection de la première dose).

Les profils de concentrations simulés par ce modèle PBPK montrent un pic précoce dans le plasma (Figure 44 – Panel A) en accord avec l'absorption rapide de la PMB à partir de son site d'injection (tissu sous-cutané), et des pics tout aussi précoces dans le muscle et le poumon (Figure 44 – Panels B & C), suggérant une distribution tissulaire rapide.

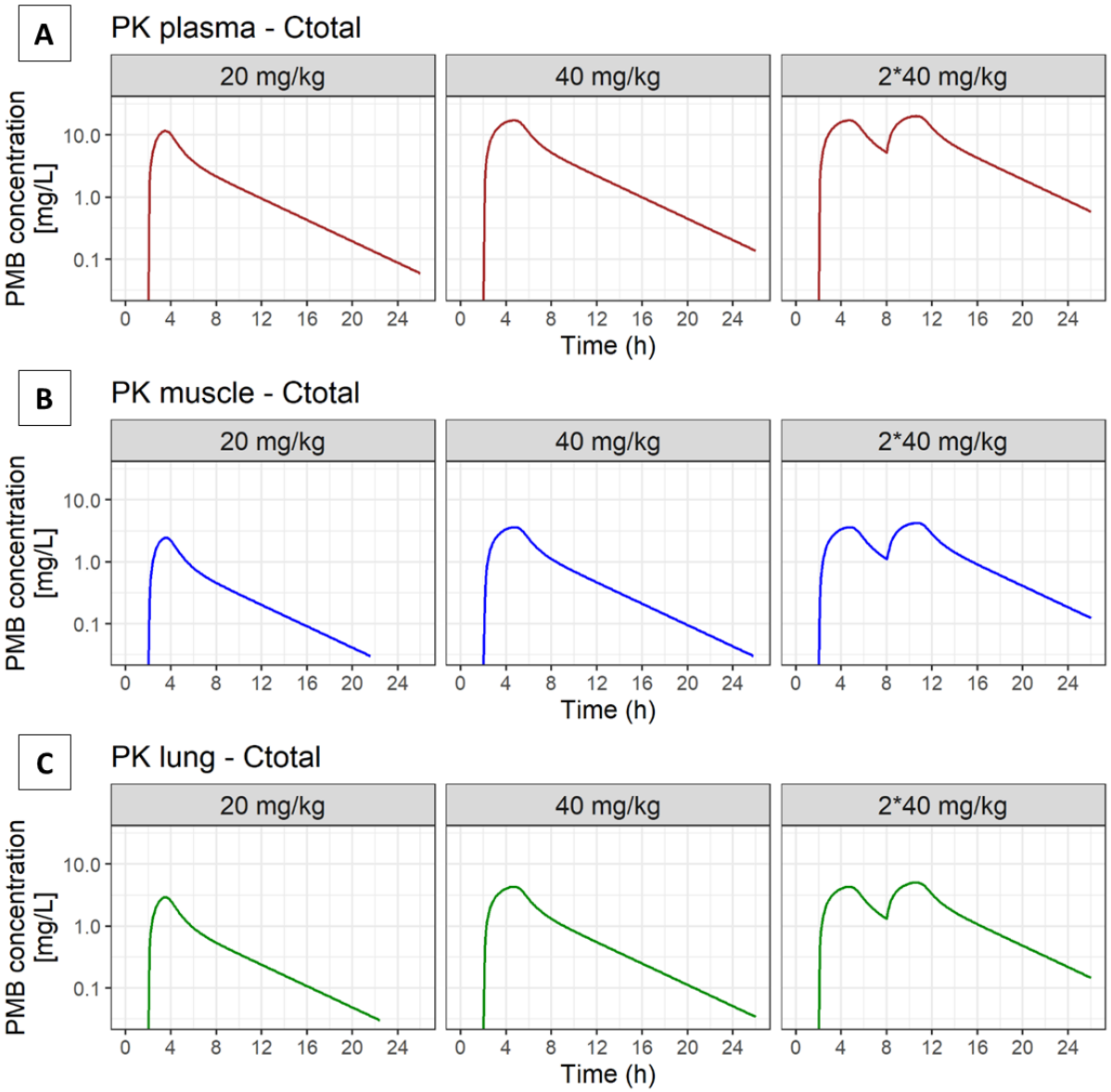


Figure 44: *Simulations réalisées avec le modèle PBPK des concentrations de PMB totales dans le plasma, le poumon et le muscle*

Ces courbes d'évolution des concentrations tissulaires (partie PK) ont été combinées aux modèles PD développés en CAMHB dans l'article 2 pour la cuisse et dans l'article 3 pour le poumon avec la souche AB121-D0, afin de prédire la courbe d'évolution des CFU en fonction du temps dans les tissus (Figure 45).

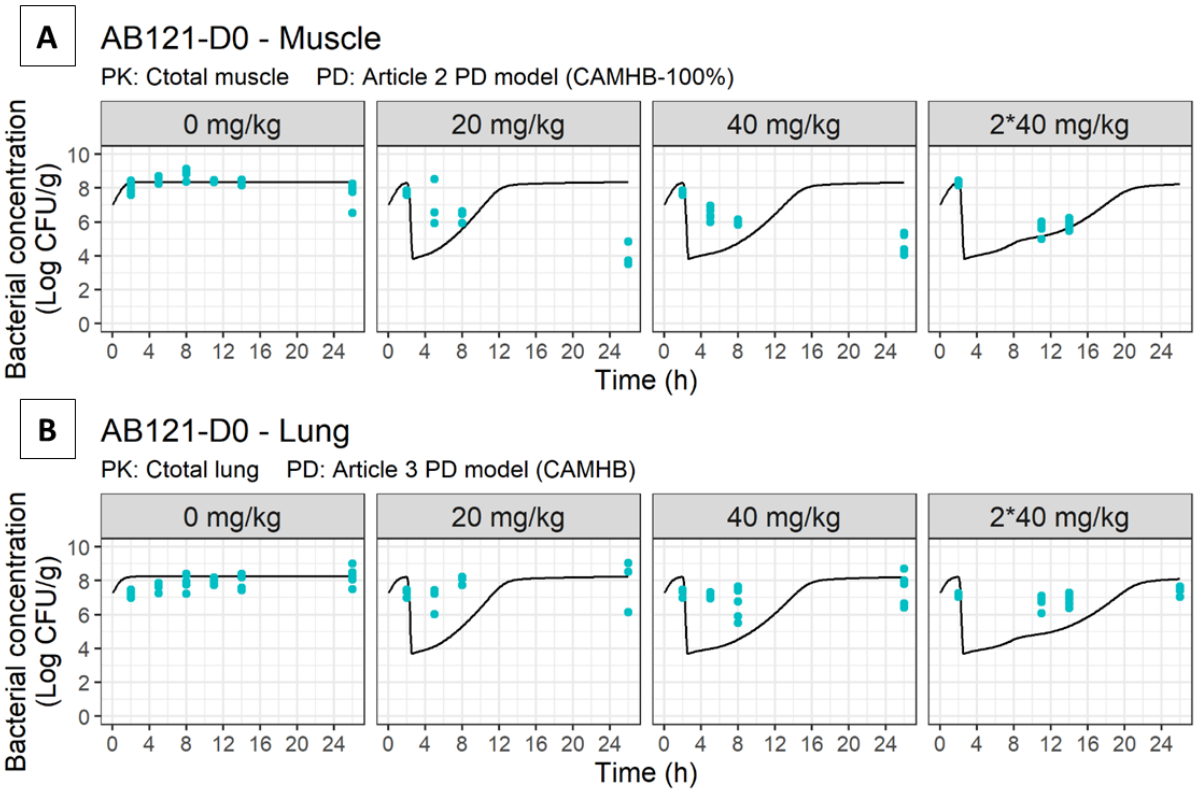


Figure 45: *Nombre de bactéries dans le muscle et le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB.*
Panel A[1] *: Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations totales tissulaires de la PMB dans le muscle avec le modèle PD développé dans l'article 2 (basée sur des données de TK en CAMHB-100%).*
Panel B *: Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations totales tissulaires de la PMB dans le poumon avec le modèle PD développé dans l'article 3 (basée sur des données de TK en CAMHB). Les points turquoises représentent les données expérimentales et les lignes noires représentent les prédictions du modèle PK/PD.*

Cette figure montre que l'effet prédit est supérieur à celui observé (Figure 45) tant dans le muscle que dans le poumon, ce qui souligne au moins deux limites dans cette approche. D'une part PK-Sim®, comme les autres logiciels de PBPK, utilisent des coefficients de partage tissu/plasma permettant de prédire des concentrations tissulaires totales alors que la modélisation PK/PD nécessite l'usage de concentrations libres, comme rappelé

[1] Les données à 26h pour la dose de 2*40 mg/kg, sont manquantes pour le modèle de la cuisse, du fait de la toxicité engendrée par cette dose, ayant induit le sacrifice des souris avant la fin de l'expérience.

précédemment. Les concentrations libres efficaces, ne pouvant être que plus faibles que les concentrations totales, l'effet prédit en utilisant celles-ci risque d'être surestimé.

D'autre part, si les concentrations tissulaires simulées par le modèle PBPK sont probablement relativement fiables pour le muscle, ceci pourrait ne pas être le cas pour le poumon. En effet la fixation de la PMB à la mucine est une caractéristique spécifique de cette molécule, et cela est susceptible d'affecter ses concentrations pulmonaires totales ; ce qui n'est pas pris en compte par PK-Sim®. Les concentrations totales de PMB dans le poumon seraient donc potentiellement supérieures aux concentrations totales dans le muscle qui ne contient pas de mucine. Or les concentrations musculaires et pulmonaires totales de PMB prédites par logiciel sont quasiment identiques (Figure 46). Le faible écart observé entre les deux étant dû à la différence des débits d'organes.

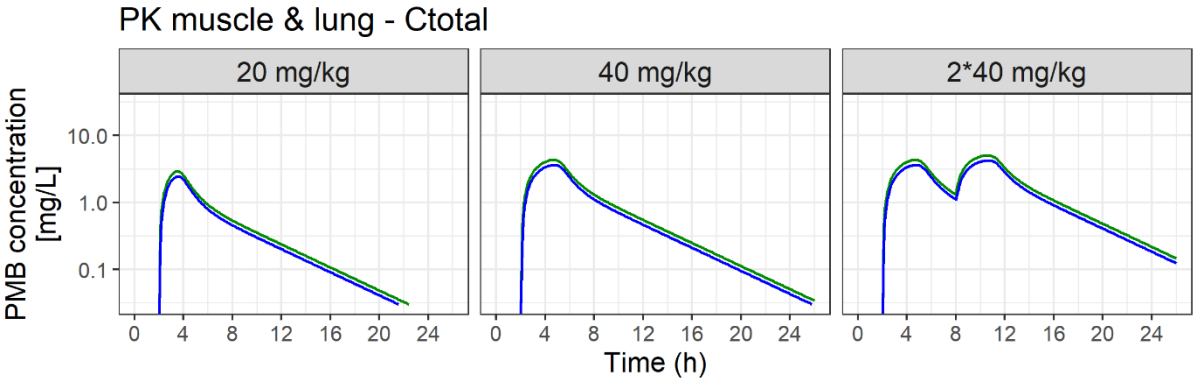


Figure 46: *Simulations réalisées avec le modèle PBPK des concentrations de PMB totales dans le muscle (bleu) et le poumon (vert).*

Par ailleurs le tissu pulmonaire étant hétérogène, il faudrait pouvoir estimer des concentrations locales à l'endroit où sont véritablement situées les bactéries, plutôt qu'une concentration pulmonaire moyenne libre. Des modèles « PBPK poumon », développés spécifiquement pour répondre à cet objectif (375) pourraient être utilisés à l'avenir.

Ainsi, plutôt que prédire des concentrations tissulaires totales par modélisation PBPK et devoir ensuite les convertir en concentrations libres pertinentes pour la modélisation PK/PD, une alternative a été recherchée.

En considérant que seules les molécules de PMB non liées dans le plasma, donc sous forme libre, pénètrent dans les tissus, et en posant comme hypothèse que ce passage s'effectue par simple diffusion passive, il est possible d'en déduire qu'à l'équilibre, les concentrations libres dans le plasma et dans le liquide interstitiel tissulaire sont identiques.

Ceci pourrait ne pas être vérifié dans principalement deux cas particuliers (376), d'une part si la PMB était substrat de systèmes de transport actif présents au niveau du muscle ou/et du poumon, ou d'autre part dans le cas d'une dégradation périphérique de la PMB dans ces deux organes. A notre connaissance, il n'existe pas d'éléments suggérant que ceci s'applique au cas particulier de la diffusion de la PMB dans ces deux organes. Il est donc possible de considérer que les concentrations tissulaires libres de la PMB à l'équilibre sont égales aux concentrations plasmatiques libres correspondantes (et après intégration en fonction du temps : $AUC_{u,tissu} = AUC_{u,plasma}$) (Figure 47).

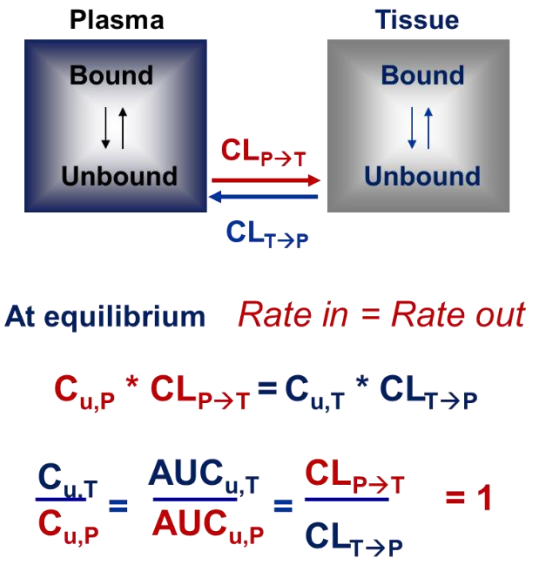


Figure 47: *Représentation schématique de la distribution extravasculaire des principes actifs, montrant qu'à l'équilibre, la concentration libre (Cu) est identique dans le compartiment vasculaire et extravasculaire (377)*

De plus la modélisation PBPK ayant prédit des pics de concentrations pratiquement aussi précoces dans les tissus que dans le plasma, il est possible de considérer que les profils de concentrations libres tissulaires et plasmatiques sont superposés. Les concentrations

plasmatiques totales mesurées chez la souris, et corrigées par la valeur de *f*u plasmatique, elle aussi déterminée expérimentalement chez la souris (*f*u = 0.173) (154) peuvent donc être utilisées pour la modélisation PK/PD *in vivo* (Figure 48).

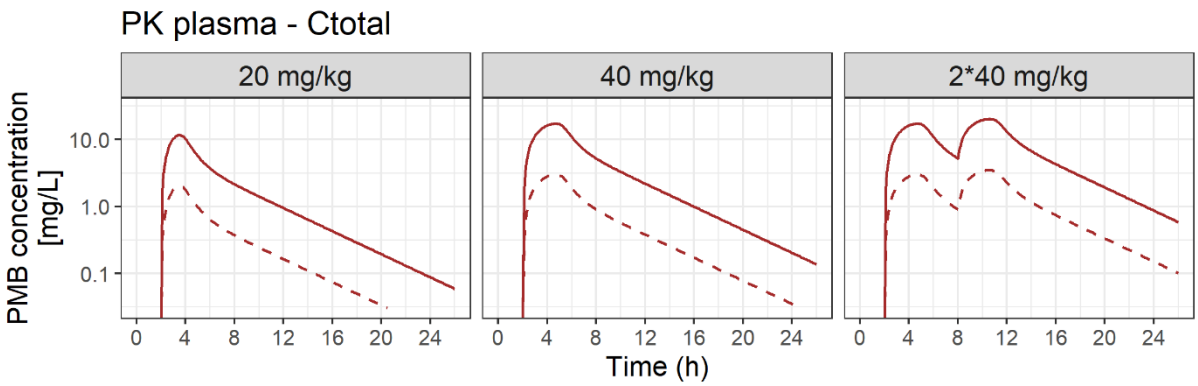


Figure 48: *Simulations des concentrations de PMB totale (trait plein) et libre (pointillé) dans le plasma. Simulations réalisées avec le modèle PK développé par Chauzy et al. (154).*

Les évolutions des CFU en fonction du temps, simulées à partir de ces valeurs de concentrations tissulaires libres, ne sont cependant pas confirmées par les valeurs expérimentales (Figure 49). La conversion des concentrations totales ayant servi pour les simulations présentées sur la Figure 48, en concentrations libres, n'a donc pas permis d'améliorer les simulations. En particulier, celles-ci prédisent toujours une rapide décroissance initiale des CFU en fonction du temps, qui n'est pas observée *in vivo*.

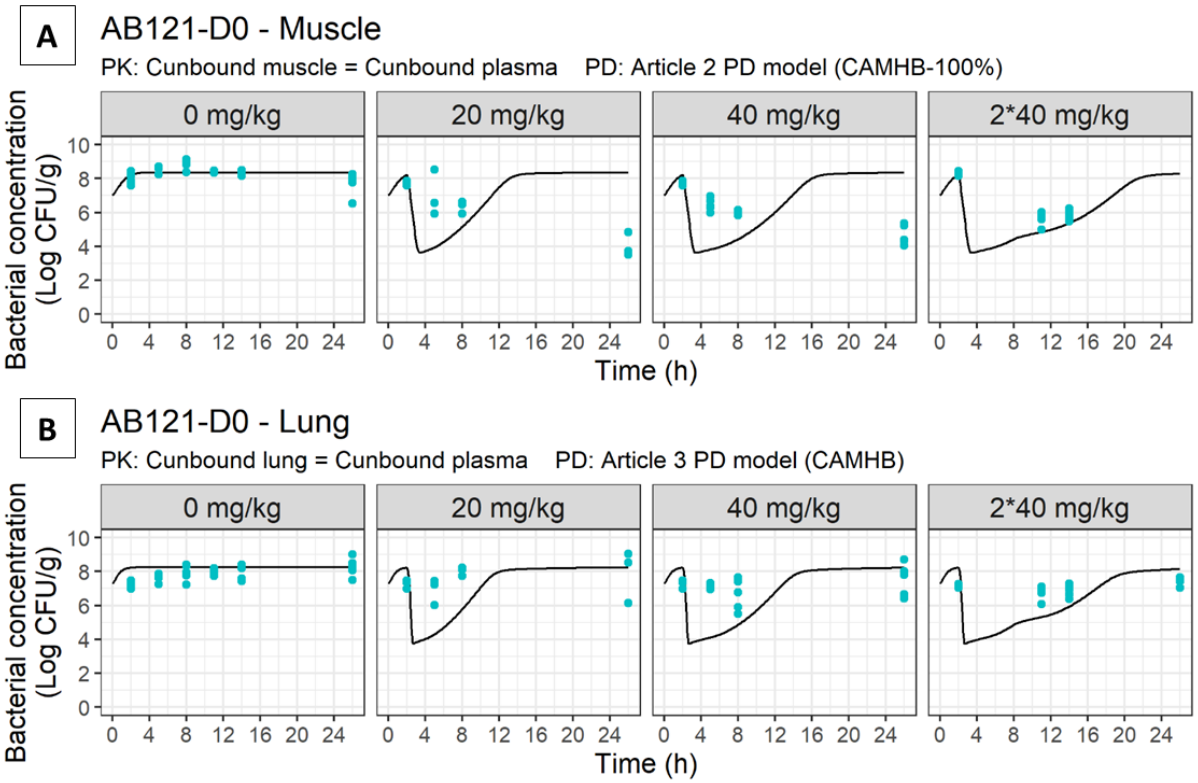


Figure 49: *Nombre de bactéries dans le muscle et le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB.*
Panel A *: Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations libres plasmatiques de la PMB dans le muscle avec le modèle PD développé dans l'article 2 (basée sur des données de TK en CAMHB-100%).* ***Panel B*** *: Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations libres plasmatiques de la PMB dans le poumon avec le modèle PD développé dans l'article 3 (basée sur des données de TK en CAMHB). Les points turquoises représentent les données expérimentales et les lignes noires représentent les prédictions du modèle PK/PD.*

Ces différences entre données simulées et observées sont difficiles à expliquer, mais il apparaît clairement que *in vivo*, l'effet bactéricide initial est bien moindre que celui prédit par la modélisation PD *in vitro* obtenue à partir de données de TK. Il pourrait maintenant être intéressant de comparer des effets prédits par la modélisation pour des traitements en doses répétées, à ceux observés par des expériences de Hollow-Fiber, afin de tester les performances du modèle dans des conditions mimant la clinique.

Ayant précédemment montré que le CAMHB commercial, riche en nutriments, favorisait les repousses observées *in vitro* durant les expériences de TK, et cela se traduisant par une augmentation de l'$Emax_R$ et de l'EC_{50R} avec la dilution du milieu, nous avons voulu déterminer si cela pouvait contribuer aux différences observées entre les données prédites et observées *in vivo*. Les simulations précédemment obtenues en utilisant les valeurs d'$Emax_R$ et EC_{50R} correspondant au milieu CAMHB-100% de l'article 2, ont ainsi été comparées à celles correspondant au CAMHB-10% (Figure 50).

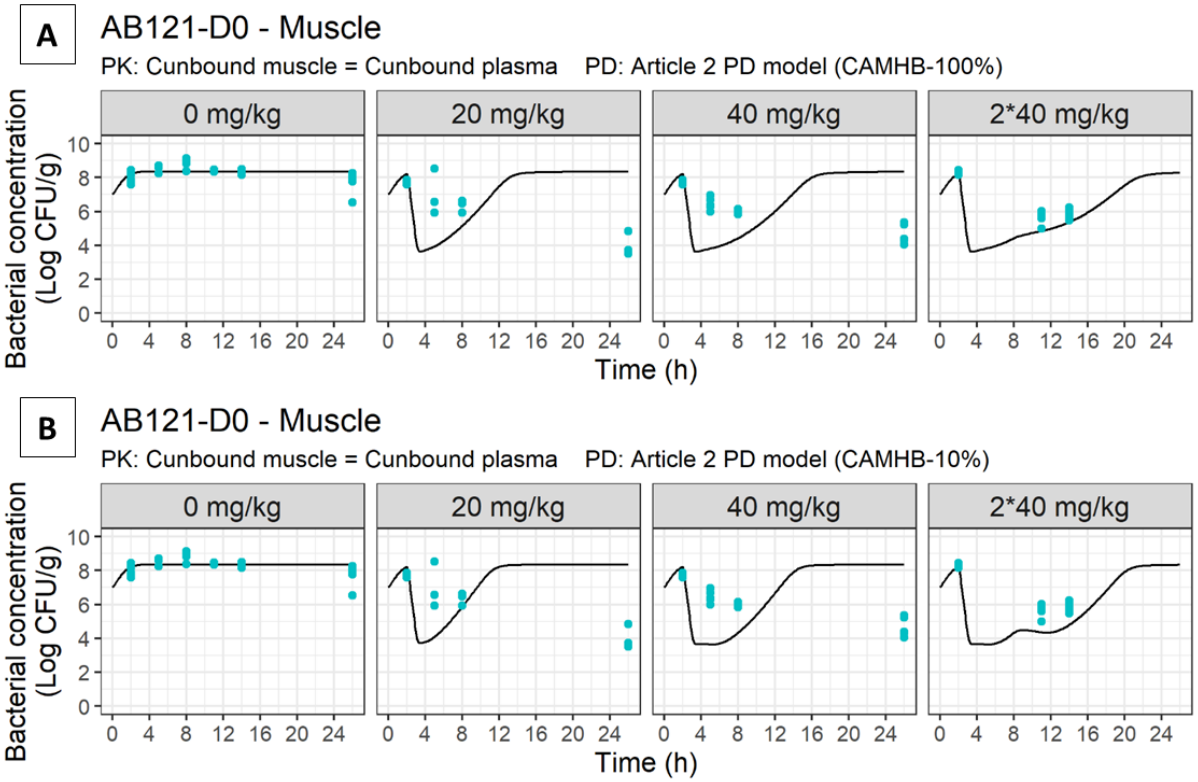


Figure 50: *Nombre de bactéries dans le muscle (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB.*
Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations libres plasmatiques de la PMB dans le muscle avec le modèle PD développé dans l'article 2 basé sur des données de TK en CAMHB-100% (Panel A) et en CAMHB-10% (Panel B). Les points turquoises représentent les données expérimentales et les lignes noires représentent les prédictions du modèle PK/PD.

Les résultats de ces simulations montrent des différences, avec en particulier des repousses plus rapides prédites par le modèles PD dans le CAMHB-10% (Figure 50). En effet, les CFU atteignent les valeurs de plateau environ 2h plus tôt que les prédiction faîtes avec le modèle

du CAMHB-100%. Ainsi, la prise en compte de l'effet de la concentration en nutriments n'améliorait pas les prédictions.

De la même manière nous avons voulu savoir si la prise en compte de l'effet de la mucine sur l'$Emax_R$ observé *in vitro* (Article 3), pouvait améliorer les prédictions. Là encore, les simulations prenant en compte cet effet mucine sont modifiées sans toutefois mieux prédire les données *in vivo* (Figure 51).

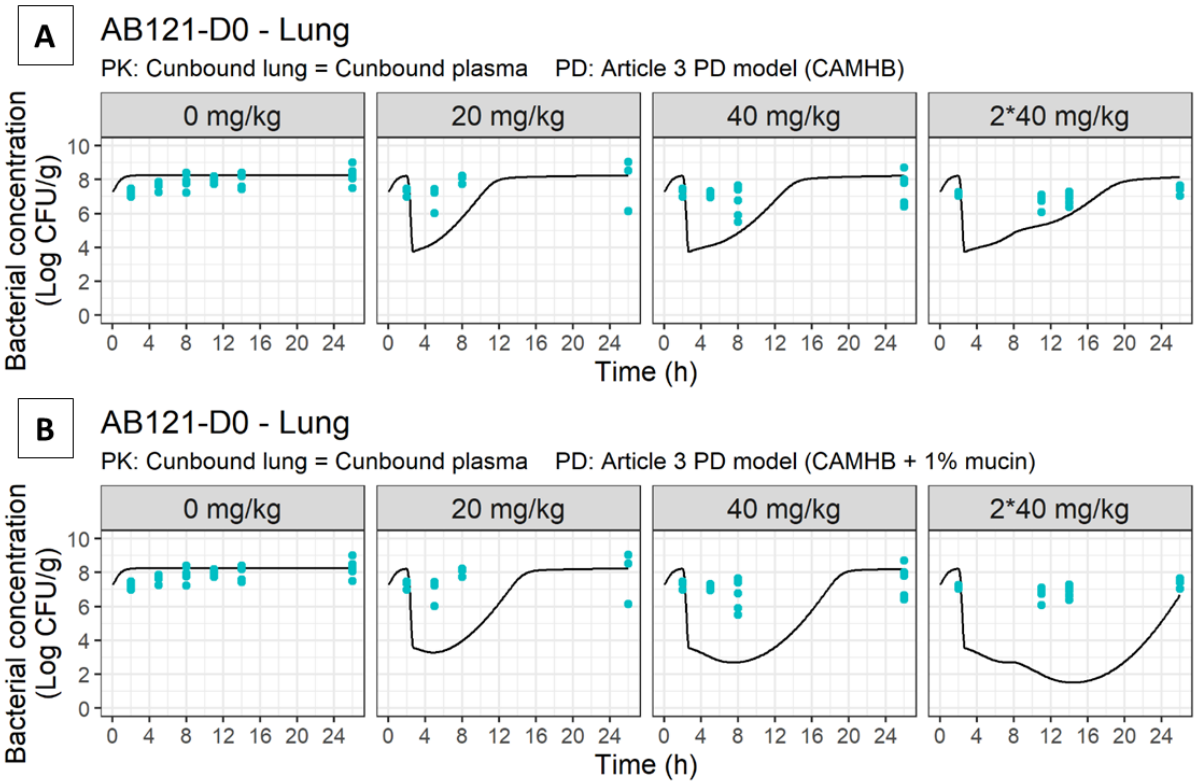


Figure 51: *Nombre de bactéries dans le poumon (Log UFC/g de tissu) en fonction du temps pour différentes doses de PMB.*
*Evolution des CFU prédits en combinant les concentrations libres plasmatiques de la PMB dans le poumon avec le modèle PD développé dans l'article 3 basé sur des données de TK en CAMHB (**Panel A**) et en CAMHB + 1% mucine (**Panel B**). Les points turquoises représentent les données expérimentales et les lignes noires représentent les prédictions du modèle PK/PD.*

En attendant mieux, plusieurs possibilités se présentent pour faire face à ces difficultés. Il est d'abord possible de coupler des données de PK tissulaire au site infectieux à l'approche PD traditionnelle (378). Il est aussi possible d'envisager des études de modélisation PK/PD des

antibiotiques uniquement à partir de données *in vivo*, sans avoir recours à des données de PD *in vitro ;* ce qui correspond à l'intérêt historique de la modélisation PK/PD (379).

Ceci a été réalisé au laboratoire dans le cadre de l'étude de l'effet inoculum *d'A. baumannii* CS01 sur l'efficacité de la PMB *in vivo* (en utilisant un modèle d'infection de la cuisse de souris immunodéprimées (154). La combinaison de l'effet inoculum observé *in vitro* à des données PK *in vivo* n'a une nouvelle fois pas permis de prédire l'efficacité *in vivo* (Figure 52).

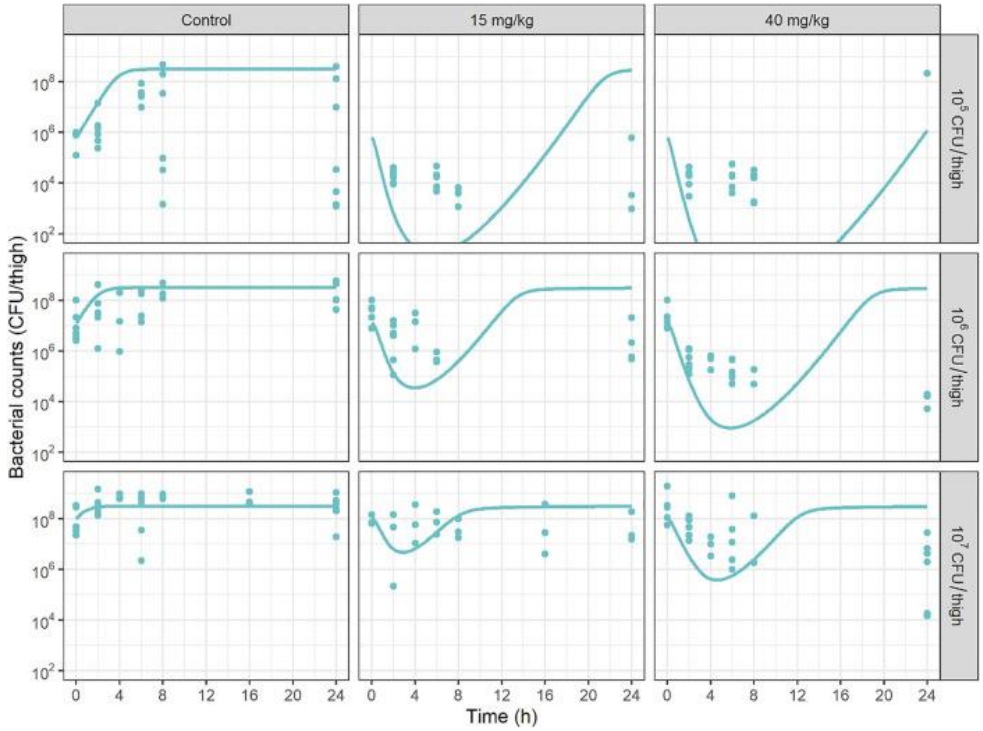


Figure 52: *Nombre de bactéries (UFC/cuisse) en fonction du temps pour différents inocula Prédits en combinant le modèle PK de la PMB, développé à partir des concentrations plasmatiques totales et libres chez la souris, avec le modèle PD précédemment développé pour caractériser l'effet inoculum in vitro (340). Les cercles pleins représentent les données expérimentales et les lignes pleines représentent les prédictions du modèle. Figure d'après (154).*

La modélisation PK/PD a alors été réalisée directement et uniquement à partir des données *in vivo* (PK et PD). Une meilleure description des données a alors été obtenue, mais avec un modèle PD simplifié (Figure 53). Notamment, le modèle d'effet utilisé pour décrire les données *in vivo* inclut une seule population bactérienne et ne présente pas de phénomène d'adaptation, contrairement au modèle PD *in vitro* (Figure 53).

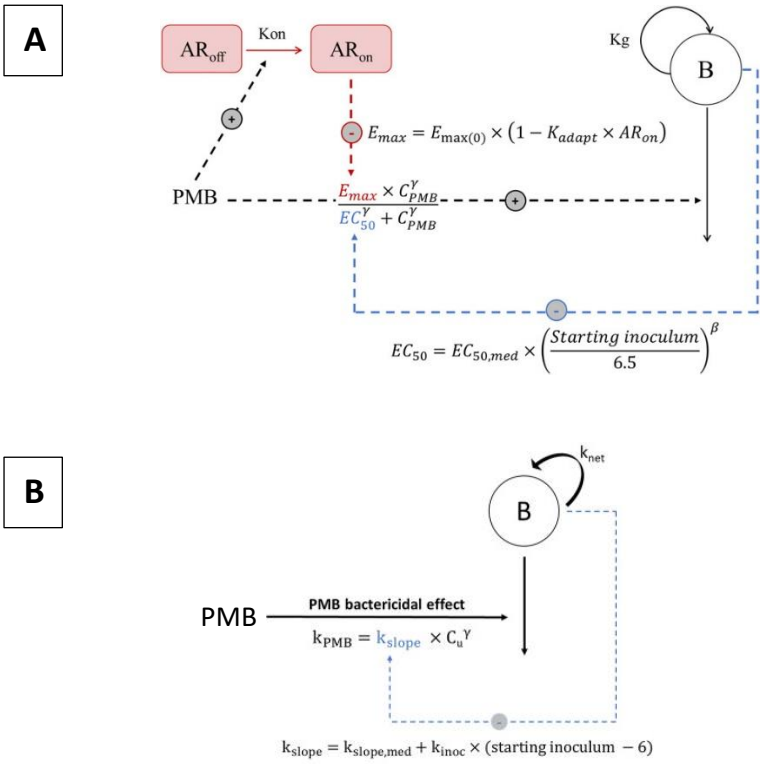


Figure 53: *Représentation des modèles PK/PD utilisé pour décrire l'effet inoculum in vitro (A) (340) et in vivo (B) (154).*
Abréviations : SC : sous-cutané, PMB : concentration de PMB (mg/L), B : Nombre de bactérie (UFC/mL pour le modèle in vitro et UFC/cuisse pour le modèle in vivo)

Il reste alors à savoir si les phénomènes typiquement observés *in vitro* lors des expériences de TK avec *A. baumannii* et plus généralement les bactéries à Gram négatif (décroissance rapide suivies de repousses) disparaissent *in vivo*, ou s'ils existent toujours mais ne sont plus observables en utilisant les modèles expérimentaux murins d'infections aigües. La première hypothèse pourrait correspondre à une différence d'accessibilité de la PMB à la bactérie *in vivo* et *in vitro*. En effet, bien que le modèle PBPK prédise une diffusion rapide de la PMB dans le muscle et le poumon, celle-ci pourrait être plus lente *in vivo* dans le microenvironnement de la bactérie, du fait d'éléments environnementaux tels que des biofilms, protégeant la bactérie, au moins dans le poumon. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, l'absence de décroissance rapide *in vivo*. La seconde hypothèse tient au fait que la collecte de données *in vivo* est beaucoup plus contraignante et ainsi la quantité d'information est beaucoup plus restreinte. De plus l'observation des données expérimentales illustre une grande variabilité des données *in vivo*. Ceci est accentué par le fait que les prélèvements nécessitent le sacrifice des animaux, avec dans le meilleur des cas une mesure de concentration d'antibiotique et de

CFU par animal, mais souvent une seule des deux. En particulier, il est souvent possible de quantifier les CFU aux temps tardifs mais pas les concentrations d'antibiotiques du fait de leur élimination rapide chez les souris. Enfin les expérimentations *in vivo* offrent souvent peu de flexibilité en termes de choix de l'inoculum de départ, surtout dans le poumon, qui doit être adapté pour instaurer une infection et caractériser un effet antibiotique dont la dose est souvent limitée par la toxicité, ce qui constitue une réelle contrainte dans le cas de la PMB. A titre d'exemple, la gamme des concentrations d'antibiotiques utilisée *in vitro* pour les TK, n'est pas limitée par la toxicité et peut ainsi être beaucoup plus large que celle rencontrée *in vivo*. Les modèles développés *in vitro* vont alors pouvoir décrire des phénomènes de saturation qui ne sont pas observables *in vivo*, comme cela a été le cas avec la saturation de la PMB sur la mucine.

Ainsi, l'ensemble de ces observations suggère qu'à ce stade, la modélisation PK/PD utilisant des données PK *in vivo* et des données PD *in vitro* issues de TK, ne permet pas de prédire l'activité des antibiotiques *in vivo*.

CONCLUSION

L'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse a permis de démontrer l'intérêt potentiel de la modélisation PK/PD semi-mécanistique *in vitro* par rapport à l'approche traditionnelle utilisant les index PK/PD dérivés de la CMI. En particulier, pour les phénomènes de décroissance suivie de repousse observés de manière quasi-systématique avec les bactéries à Gram négatif, lors des expériences de TK. Ces phénomènes qui traduisent une modification de l'efficacité apparente de la PMB avec le temps, ne sont pas détectables par les mesures de CMI.

Mais comme le nom l'indique, ces modèles sont seulement semi-mécanistiques, considérant deux sous-populations bactériennes de sensibilités différentes à l'antibiotique ou une seule population capable de perdre sa sensibilité par adaptation. Toutefois, ce type de modélisation ne requiert pas d'informations mécanistiques précises et le choix du modèle repose uniquement sur des critères statistiques. L'apport de données mécanistiques obtenues par séquençage et transcriptomique pourrait permettre d'améliorer ces modèles. Cependant nos travaux ont montré que l'intégration de ces données complexes dans les modèles est délicate.

Les modélisations PD semi-mécanistiques permettent donc de décrire mais pas d'expliquer ni *a fortiori* prédire des différences observées entre souches. De plus, l'autre limite de ces approches réside dans la difficulté pour une même souche, d'extrapoler les résultats des modélisations PD *in vitro* afin de prédire l'efficacité *in vivo*.

Cependant la modélisation PK/PD a montré son intérêt dans à peu près toutes les classes thérapeutiques et constitue le meilleur moyen de prédire aussi bien les effets thérapeutiques princeps des principes actifs que leurs effets indésirables. Cette approche reste donc très prometteuse en antibiothérapie pour prédire la capacité des antibiotiques à traiter les infections, sans favoriser l'émergence ni le développement de résistances, et sans entraîner de toxicité. Par ailleurs des modèles PK/PD peuvent être développés pour l'étude des combinaisons d'antibiotiques, fréquemment utilisées pour traiter les infections sévères.

Pour conclure, l'antibiorésistance est devenue un problème de santé publique majeur dont nos gouvernants ont pris conscience. De nombreux appels d'offres sont parus ces dernières années tant au niveau national qu'européen, afin de financer des programmes de recherche ambitieux et pluridisciplinaire, au sein desquels la modélisation PK/PD trouve toute sa place.

Annexe

Annexe

1. Matériels et Méthodes des expériences PK/PD *in vivo*

1.1. Produits chimiques et souches

La polymyxine B (PMB) a été obtenue auprès de Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Saint-Quentin Fallavier, France) et utilisée pour préparer des solutions mères dans de l'eau stérile.

Une souche clinique multi-résistante (MDR) d'*Acinetobacter baumannii* a été utilisée dans le cadre de cette étude (AB121-D0). La CMI vis-à-vis de la PMB a été déterminée conformément aux recommandations de l'EUCAST et du CLSI (380, 159), et était de 1 mg/L.

1.2. Modèle d'infection de souris neutropéniques

Les expériences *in vivo* sur les souris ont été réalisées conformément à la directive européenne 2010/63/E. Elles ont été autorisées par le comité d'éthique local (COMETHEA) et enregistrées par le ministère français de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (numéros d'approbation : APAFIS #32085-202106221607456 v4). Des souris Swiss RjOrl mâles âgées de quatre semaines ont été obtenues auprès des laboratoires Janvier (Saint-Berthevin, France). À leur arrivée, les souris ont été divisées en groupes de 3 à 5 animaux, et placées dans un environnement thermostaté avec enrichissement et libre accès à l'eau et à la nourriture pendant un minimum de 8 jours avant le début de l'expérience et jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids de 30 ± 5 g (moyenne ± écart-type) par animal. Une couverture antalgique a été assurée continuellement durant les expérimentations avec des injections de buprénorphine (0.1 mg/kg, 10 mL/kg) toutes les 4h pendant la journée après une première administration 15min avant l'infection, et avec une supplémentation de l'eau de boisson (0.009 mg/mL) la nuit.

Toutes les souris ont reçu deux injections intrapéritonéales de cyclophosphamide quatre jours (150 mg/kg) et un jour (100 mg/kg) avant le début de l'expérience afin d'induire et de maintenir une neutropénie (381).

1.2.1. Modèle d'infection de la cuisse

Des souris neutropéniques ont été infectées par injection de 100µL d'une suspension bactérienne d'*A. baumannii* AB121-D0 à 5.10^7 UFC/mL (correspondant à un inoculum de départ de 5.10^6 UFC/souris) dans le muscle postérieur de l'une des cuisses.

1.2.2. Modèle d'infection pulmonaire

Après anesthésie par inhalation d'isoflurane 2.5-3%, une suspension bactérienne de 1.10^8 UFC/mL a été injectée (50µL) dans la trachée des souris inclinées sur un plan à 45°, à l'aide d'une canule 24G incurvée (≈25-30°) attachée à une seringue afin d'obtenir un inoculum de départ de 5.10^6 CFU/souris dans les poumons. Les souris étaient ensuite maintenues en position verticale pendant 1 min, avant d'être replacées dans leur cage pour récupérer de l'anesthésie.

1.2.3. Traitement par la PMB et prélèvements PD

Deux heures après l'infection bactérienne, les souris ont reçu par voie sous-cutanée une dose (20 ou 40 mg/kg) ou deux doses de PMB (2 injections de 40 mg/kg à 6h d'intervalle).

A différents temps (T2h après l'inoculation bactérienne, T5h, T8h, T11h, T14h, T26h), les souris (n=5 par dose et par temps) ont été anesthésiées avec de l'isoflurane 2.5-3% et sacrifiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (150mg/kg) pour permettre le prélèvement des organes (cuisse ou poumons). Après leur prélèvement aseptique, les organes ont été homogénéisés dans du NaCl 0.9% (2mL pour la cuisse et 1mL pour les poumons), dilués en série dans du NaCl 0.9% et déposés sur une gélose d'agar Mueller-Hinton pour le comptage des bactéries 24h après incubation à 35°C.

1.3. Modèle PBPK

Le modèle PK de la PMB précédemment développé à partir des concentrations plasmatiques totales chez la souris (154), a été modifié pour caractériser la distribution de la PMB dans les muscles et les poumons avec le rajout de deux compartiments représentant les poumons et les muscles. La concentration de la molécule dans ces deux compartiments a été décrite par les équations suivantes :

$$\frac{d(C_{muscle})}{d(t)} = \frac{Q_{muscle} \times RBP \times (C_{central} - \frac{C_{muscle}}{Kp_{muscle}})}{V_{muscle}} \quad \text{(Equation 4)}$$

$$\frac{d(C_{lung})}{d(t)} = \frac{Q_{lung} \times RBP \times (C_{central} - \frac{C_{lung}}{Kp_{lung}})}{V_{lung}} \quad \text{(Equation 5)}$$

Où Q représente le débit sanguin (L/h/kg), RBP le ratio des concentrations entre le sang total et le plasma, C la concentration de PMB (mg/L), Kp le coefficient de partage entre les tissus et le plasma, et V le volume de l'organe (L/kg).

Table 4 : *Paramètres du modèle PBPK*

*** parameter obtained with PK-Sim (version 10.0, Open Systems Pharmacology, Bayer Technology services, Leverkusen, Germany)*

Parameter	Description (Unit)	Estimate
kabsmax_pmb	Maximum rate for saturable absorption of polymyxin B (mg/h/kg)	14.7
kabs50_pmb	Polymyxin B amount in subcutaneous absorption compartment at half-maximum of saturable absorption (mg/kg)	2.24
CL_pmb	Linear elimination clearance of polymyxin B(L/h/kg)	0.437
Vc_pmb	Central volume of distribution of polymyxin B (L/kg)	0.740
Vp_pmb	Peripheral volume of distribution of polymyxin B(L/kg)	0.743
CLcp_pmb	Inter-compartmental clearance of polymyxin B (L/h/kg)	0.315
Q_muscle	blood flow for muscle (L/h/kg)	2.44
V_muscle	muscle volume (L/kg)**	0.3125
Kp_muscle	partition coefficient between muscle and plasma	0.21
Q_lung	blood flow for lung (L/h/kg)	14.64
V_lung	lung volume (L/kg)**	0.00447
Kp_lung	partition coefficient between lung and plasma**	0.25
RBP	Ratio blood-plasma**	0.6

2. Résultats PD *in vivo*

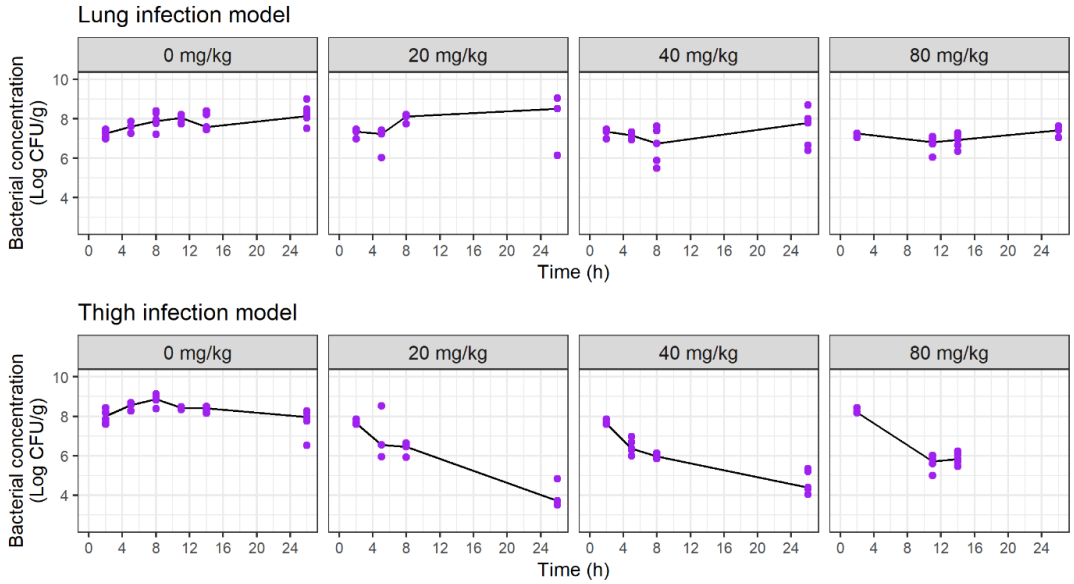


Figure 54: *Evolution du nombre de bactéries au cours du temps chez des souris infectées dans la cuisse et dans les poumons avec A. baumannii AB121-D0.*
Les lignes représentent la médiane des réplicas et les points violets, les données observées.

3. Simulation PK/PD

Table 5 : *Paramètres des modèles PD pour l'infection de la cuisse*

Parameter	Description (Unit)	Article 2 Estimate	
		CAMHB-100%	CAMHB-10%
INOC	Initial inoculum in thigh (Log_{10} CFU/mL)	7.00	
BMAX	Maximum bacterial population size *in vivo* (Log_{10} CFU/mL)	8.35	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum	-4.88	
Knet	Apparent growth rate constant (K_{growth}-K_{death}) (h^{-1})	2.02	
$Emax_S$	Maximum rate of PMB effect for susceptible (h^{-1})	12.8	
EC_{50S}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for susceptible (mg/L)	0.137	
$Emax_R$	Maximum rate of PMB effect for resistant (h^{-1})	1.87	3.04
EC_{50R}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant (mg/L)	0.425	1.60
y	Hill coefficient	1.27	

Table 6: *Paramètres des modèles PD pour l'infection du poumon*

Parameter	Description (Unit)	Article 3 Estimate	
		Mucin	
		Without	with
INOC	Initial inoculum in lung (Log_{10} CFU/mL)	7.27	
BMAX	Maximum bacterial population size *in vivo* (Log_{10} CFU/mL)	8.24	
MUT	Proportion of mutant in the inoculum	-4.63	
Knet	Apparent growth rate constant (K_{growth}-K_{death}) (h^{-1})	2.69	
$Slope_S$	Maximum kill rate constante of PMB effect for susceptible (h^{-1})	29.9	
$Emax_R$	Maximum rate of PMB effect for resistant (h^{-1})	2.7	3.74
EC_{50R}	PMB concentration needed to reach 50% of Emax for resistant (mg/L)	0.411	

RÉFÉRENCES

Références

1. Aminov RI. 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. Front Microbiol 1:134.

2. Pfizer's work on penicillin for World War II becomes a National Historic Chemical Landmark. American Chemical Society. https://www.acs.org/pressroom/newsreleases/2008/june/pfizers-work-on-penicillin-for-world-war-ii-becomes-a-national-historic-chemical-landmark.html. Retrieved 25 September 2023.

3. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. 2019. Antibiotics: past, present and future. Current Opinion in Microbiology 51:72–80.

4. Butler MS, Henderson IR, Capon RJ, Blaskovich MAT. 2023. Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. 8. J Antibiot 76:431–473.

5. Surveillance Atlas of Infectious Diseases. http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx. Retrieved 25 September 2023.

6. Achaogen bankruptcy raises worry over antibiotic pipeline | CIDRAP. https://www.cidrap.umn.edu/antimicrobial-stewardship/achaogen-bankruptcy-raises-worry-over-antibiotic-pipeline. Retrieved 25 September 2023.

7. Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data. https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data. Retrieved 13 March 2023.

8. Langford BJ, So M, Simeonova M, Leung V, Lo J, Kan T, Raybardhan S, Sapin ME, Mponponsuo K, Farrell A, Leung E, Soucy J-PR, Cassini A, MacFadden D, Daneman N, Bertagnolio S. 2023. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Microbe 4:e179–e191.

9. Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, Dingle TC, Chen JZ, Tyrrell GJ, Ronksley PE, Barkema HW. 2022. Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019-June 2021). Antimicrob Resist Infect Control 11:45.

10. Beijerinck, M.W. 1911. Pigments as products of oxidation by bacterial action KNAW, Proceedings, 1910-1911,:1066–1077.

11. Brisou J. 1953. [Essay on the system of the genus Achromobacter]. Ann Inst Pasteur (Paris) 84:812–814.

12. Brisou J, Prevot AR. 1954. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group]. Ann Inst Pasteur (Paris) 86:722–728.

13. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. 1968. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). J Bacteriol 95:1520–1541.

14. Bouvet PJM, Grimont PAD. 1986. Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the Recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and Emended Descriptions of Acinetobacter

calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 36:228–240.

15. Jung J, Park W. 2015. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 99:2533–2548.

16. Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview. Microbes Environ 26:101–112.

17. Kempf M, Abdissa A, Diatta G, Trape J-F, Angelakis E, Mediannikov O, La Scola B, Raoult D. 2012. Detection of Acinetobacter baumannii in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. International Journal of Infectious Diseases 16:e680–e683.

18. Mara K, Decorosi F, Viti C, Giovannetti L, Papaleo MC, Maida I, Perrin E, Fondi M, Vaneechoutte M, Nemec A, van den Barselaar M, Dijkshoorn L, Fani R. 2012. Molecular and phenotypic characterization of Acinetobacter strains able to degrade diesel fuel. Research in Microbiology 163:161–172.

19. Details - Public Health Image Library(PHIL). https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=6498. Retrieved 25 September 2023.

20. Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev 67:593–656.

21. Di Lorenzo F, Duda KA, Lanzetta R, Silipo A, De Castro C, Molinaro A. 2022. A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. Chem Rev 122:15767–15821.

22. Weber BS, Harding CM, Feldman MF. 2016. Pathogenic Acinetobacter: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. J Bacteriol 198:880–887.

23. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. 1997. Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. Journal of Clinical Microbiology 35:2819–2825.

24. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. 1999. Distribution of Acinetobacter Species on Skin of Healthy Humans. EJCMID 18:179–183.

25. Ly TDA, Kerbaj J, Edouard S, Hoang VT, Louni M, Dao TL, Benkouiten S, Badiaga S, Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Mediannikov O, Gautret P. 2019. The Presence of Acinetobacter baumannii DNA on the Skin of Homeless People and Its Relationship With Body Lice Infestation. Preliminary Results. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 9.

26. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. 2002. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment. Clinical Microbiology and Infection 8:687–693.

27. Townsend J, Park AN, Gander R, Orr K, Arocha D, Zhang S, Greenberg DE. 2015. Acinetobacter Infections and Outcomes at an Academic Medical Center: A Disease of Long-Term Care. Open Forum Infectious Diseases 2:ofv023.

28. Acinetobacter baumannii Infections Among Patients at Military Medical Facilities Treating Injured U.S. Service Members, 2002--2004. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5345a1.htm. Retrieved 7 September 2023.

29. Calhoun JH, Murray CK, Manring MM. 2008. Multidrug-resistant Organisms in Military Wounds from Iraq and Afghanistan. Clin Orthop Relat Res 466:1356–1362.

30. Sheppard FR, Keiser P, Craft DW, Gage F, Robson M, Brown TS, Petersen K, Sincock S, Kasper M, Hawksworth J, Tadaki D, Davis TA, Stojadinovic A, Elster E. 2010. The majority of US combat casualty soft-tissue wounds are not infected or colonized upon arrival or during treatment at a continental US military medical facility. The American Journal of Surgery 200:489–495.

31. Ayobami O, Willrich N, Harder T, Okeke IN, Eckmanns T, Markwart R. 2019. The incidence and prevalence of hospital-acquired (carbapenem-resistant) Acinetobacter baumannii in Europe, Eastern Mediterranean and Africa: a systematic review and meta-analysis. Emerg Microbes Infect 8:1747–1759.

32. Papazian L, Klompas M, Luyt C-E. 2020. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. Intensive Care Med 46:888–906.

33. Huang Y, Zhou Q, Wang W, Huang Q, Liao J, Li J, Long L, Ju T, Zhang Q, Wang H, Xu H, Tu M. 2019. Acinetobacter baumannii Ventilator-Associated Pneumonia: Clinical Efficacy of Combined Antimicrobial Therapy and in vitro Drug Sensitivity Test Results. Front Pharmacol 10:92.

34. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, Aldabó-Pallás T, Cayuela A, Marquez-Vácaro JA, Garcia-Curiel A, Jiménez-Jiménez FJ. 2005. Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med 31:649–655.

35. Duployez C, Le Guern R, Milliere L, Caplan M, Loïez C, Ledoux G, Jaillette E, Favory R, Mathieu D, Wallet F. 2021. One Outbreak Could Hide Another. Jpn J Infect Dis 74:367–368.

36. Durán-Manuel EM, Cruz-Cruz C, Ibáñez-Cervantes G, Bravata-Alcantará JC, Sosa-Hernández O, Delgado-Balbuena L, León-García G, Cortés-Ortíz IA, Cureño-Díaz MA, Castro-Escarpulli G, Vélez-Reséndiz JM, Bello-López JM. 2021. Clonal dispersion of Acinetobacter baumannii in an intensive care unit designed to patients COVID-19. J Infect Dev Ctries 15:58–68.

37. Rangel K, Chagas TPG, De-Simone SG. 2021. Acinetobacter baumannii Infections in Times of COVID-19 Pandemic. Pathogens 10:1006.

38. Boral J, Genç Z, Pınarlık F, Ekinci G, Kuskucu MA, İrkören P, Kapmaz M, Tekin S, Çakar N, Şentürk E, Yurdakul F, Dikenelli B, Can F, Ergonul O. 2022. The association between Acinetobacter baumannii infections and the COVID-19 pandemic in an intensive care unit. 1. Sci Rep 12:20808.

39. Pascale R, Bussini L, Gaibani P, Bovo F, Fornaro G, Lombardo D, Ambretti S, Pensalfine G, Appolloni L, Bartoletti M, Tedeschi S, Tumietto F, Lewis R, Viale P, Giannella M. 2022. Carbapenem-resistant bacteria in an intensive care unit during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A multicenter before-and-after cross-sectional study. Infect Control Hosp Epidemiol 43:461–466.

40. Domingues S, Rosário N, Cândido Â, Neto D, Nielsen KM, Da Silva GJ. 2019. Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant Acinetobacter spp. Microorganisms 7:30.

41. Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat 13:151–171.

42. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev 21:538–582.

43. Ma C, McClean S. 2021. Mapping Global Prevalence of Acinetobacter baumannii and Recent Vaccine Development to Tackle It. Vaccines (Basel) 9:570.

44. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY, Leblebicioglu H, Abu Khader I, Miranda Novales MG, Berba R, Ramírez Wong FM, Barkat A, Pino OR, Dueñas L, Mitrev Z, Bijie H, Gurskis V, Kanj SS, Mapp T, Hidalgo RF, Ben Jaballah N, Raka L, Gikas A, Ahmed A, Thu LTA, Guzmán Siritt ME, INICC Members. 2010. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control 38:95-104.e2.

45. Mohd Sazlly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. 2019. The global prevalence of multidrug-resistance among Acinetobacter baumannii causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. J Infect 79:593–600.

46. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 18:318–327.

47. Gedefie A, Demsis W, Ashagrie M, Kassa Y, Tesfaye M, Tilahun M, Bisetegn H, Sahle Z. 2021. Acinetobacter baumannii Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review. Infect Drug Resist 14:3711–3719.

48. Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, Mao X, Xue X. 2020. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for Acinetobacter baumannii infection. Journal of Biomedical Science 27:26.

49. Medscape Registration. https://emedicine.medscape.com/article/236891-medication?form=fpf. Retrieved 9 October 2023.

50. info-antibio-2022-11-bgn-mdr.pdf.

51. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16:161–168.

52. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. Euro Surveill 21.

53. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. 2017. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in Escherichia coli. mBio 8:e00543-17.

54. Hamame A, Davoust B, Hasnaoui B, Mwenebitu DL, Rolain J-M, Diene SM. 2022. Screening of colistin-resistant bacteria in livestock animals from France. Veterinary Research 53:96.

55. Olaitan AO, Dandachi I, Baron SA, Daoud Z, Morand S, Rolain J-M. 2021. Banning colistin in feed additives: a small step in the right direction. The Lancet Infectious Diseases 21:29–30.

56. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu Rev Biochem 46:723–763.

57. Nation RL, Velkov T, Li J. 2014. Colistin and Polymyxin B: Peas in a Pod, or Chalk and Cheese? Clin Infect Dis 59:88–94.

58. PHR1595_LRAC0300.pdf.

59. Newton BA. 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. Bacteriol Rev 20:14–27.

60. Hancock RE. 1984. Alterations in outer membrane permeability. Annu Rev Microbiol 38:237–264.

61. Moore RA, Bates NC, Hancock RE. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob Agents Chemother 29:496–500.

62. Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care 10:R27.

63. Fernández L, Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Kocíncová D, Lam JS, Martínez JL, Hancock REW. 2013. Characterization of the polymyxin B resistome of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 57:110–119.

64. Trimble MJ, Mlynárčik P, Kolář M, Hancock REW. 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 6:a025288.

65. Sabnis A, Hagart KL, Klöckner A, Becce M, Evans LE, Furniss RCD, Mavridou DA, Murphy R, Stevens MM, Davies JC, Larrouy-Maumus GJ, Clarke TB, Edwards AM. 2021. Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. Elife 10:e65836.

66. Daugelavicius R, Bakiene E, Bamford DH. 2000. Stages of polymyxin B interaction with the Escherichia coli cell envelope. Antimicrob Agents Chemother 44:2969–2978.

67. Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock RE. 2000. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 44:3317–3321.

68. Tochikubo K, Yasuda Y, Kozuka S. 1986. Decreased particulate NADH oxidase activity in Bacillus subtilis spores after polymyxin B treatment. J Gen Microbiol 132:277–287.

69. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, Li J, Velkov T. 2014. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. J Antibiot (Tokyo) 67:147–151.

70. Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. 2012. Rapid killing of Acinetobacter baumannii by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. Antimicrob Agents Chemother 56:5642–5649.

71. Yu Z, Zhu Y, Qin W, Yin J, Qiu J. 2017. Oxidative Stress Induced by Polymyxin E Is Involved in Rapid Killing of Paenibacillus polymyxa. Biomed Res Int 2017:5437139.

72. Brochmann RP, Toft A, Ciofu O, Briales A, Kolpen M, Hempel C, Bjarnsholt T, Høiby N, Jensen PØ. 2014. Bactericidal effect of colistin on planktonic Pseudomonas aeruginosa is independent of hydroxyl radical formation. Int J Antimicrob Agents 43:140–147.

73. Mortensen NP, Fowlkes JD, Sullivan CJ, Allison DP, Larsen NB, Molin S, Doktycz MJ. 2009. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of Pseudomonas aeruginosa cells. Langmuir 25:3728–3733.

74. David HL, Rastogi N. 1985. Antibacterial action of colistin (polymyxin E) against Mycobacterium aurum. Antimicrob Agents Chemother 27:701–707.

75. Nakajima K, Kawamata J. 1966. Studies on the mechanism of action of colistin. IV. Activation of “latent” ribonuclease in Escherichia coli by colistin. Biken J 9:115–123.

76. Teuber M. 1967. Precipitation of ribosomes from E. coli B by polymyxin B. Naturwissenschaften 54:71.

77. Hancock RE. 1997. Peptide antibiotics. Lancet 349:418–422.

78. Nang SC, Azad MAK, Velkov T, Zhou QT, Li J. 2021. Rescuing the Last-Line Polymyxins: Achievements and Challenges. Pharmacol Rev 73:679–728.

79. Katz R. 1963. RENAL AND POSSIBLY HEPATIC TOXICITY FROM COLY-MYCIN. REPORT OF A CASE. Med Ann Dist Columbia 32:408–413.

80. Tallgren LG, Liewendahl K, Kuhlbaeck B. 1965. THE THERAPEUTIC SUCCESS AND NEPHROTOXICITY OF COLISTIN IN ACUTE AND CHRONIC NEPHROPATHIES WITH IMPAIRED RENAL FUNCTION. Acta Med Scand 177:717–728.

81. Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE. 1970. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. Ann Intern Med 72:857–868.

82. Kunin CM, Bugg A. 1971. Binding of Polymyxin Antibiotics to Tissues: The Major Determinant of Distribution and Persistence in the Body. The Journal of Infectious Diseases 124:394–400.

83. Hussein M, Oberrauch S, Allobawi R, Cornthwaite-Duncan L, Lu J, Sharma R, Baker M, Li J, Rao GG, Velkov T. 2022. Untargeted metabolomics to evaluate polymyxin B toxicodynamics following direct intracerebroventricular administration into the rat brain. Comput Struct Biotechnol J 20:6067–6077.

84. Falagas ME, Kyriakidou M, Voulgaris GL, Vokos F, Politi S, Kechagias KS. 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 24:342–359.

85. Phe K, Lee Y, McDaneld PM, Prasad N, Yin T, Figueroa DA, Musick WL, Cottreau JM, Hu M, Tam VH. 2014. In vitro assessment and multicenter cohort study of comparative nephrotoxicity rates associated with colistimethate versus polymyxin B therapy. Antimicrob Agents Chemother 58:2740–2746.

86. Liu D, Zhang J, Liu H-X, Zhu Y-G, Qu J-M. 2015. Intravenous combined with aerosolised polymyxin versus intravenous polymyxin alone in the treatment of pneumonia caused by multidrug-resistant pathogens: a systematic review and meta-analysis. Int J Antimicrob Agents 46:603–609.

87. Lu D, Mao W. 2023. Efficacy and safety of intravenous combined with aerosolised polymyxin versus intravenous polymyxin alone in the treatment of multidrug-resistant gram-negative bacterial pneumonia: A systematic review and meta-analysis. Heliyon 9:e15774.

88. World Health Organization. 2019. Critically important antimicrobials for human medicine6th rev. World Health Organization, Geneva. https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266. Retrieved 18 September 2023.

89. Giamarellou H. 2016. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. Int J Antimicrob Agents 48:614–621.

90. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, Henry R, Crane B, St. Michael F, Cox AD, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. 2010. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. Antimicrob Agents Chemother 54:4971–4977.

91. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. 2015. Retention of virulence following adaptation to colistin in Acinetobacter baumannii reflects the mechanism of resistance. J Antimicrob Chemother 70:2209–2216.

92. Mu X, Wang N, Li X, Shi K, Zhou Z, Yu Y, Hua X. 2016. The Effect of Colistin Resistance-Associated Mutations on the Fitness of Acinetobacter baumannii. Front Microbiol 7:1715.

93. Lee J-Y, Chung ES, Ko KS. 2017. Transition of colistin dependence into colistin resistance in Acinetobacter baumannii. 1. Sci Rep 7:14216.

94. Carretero-Ledesma M, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Pulido MR, Pachón J, McConnell MJ. 2018. Phenotypic changes associated with Colistin resistance due to Lipopolysaccharide loss in Acinetobacter baumannii. Virulence 9:930–942.

95. Kamoshida G, Yamada N, Nakamura T, Yamaguchi D, Kai D, Yamashita M, Hayashi C, Kanda N, Sakaguchi M, Morimoto H, Sawada T, Okada T, Kaya Y, Takemoto N, Yahiro K. 2022. Preferential Selection of Low-Frequency, Lipopolysaccharide-Modified, Colistin-Resistant Mutants with a Combination of Antimicrobials in Acinetobacter baumannii. Microbiol Spectr 10:e0192822.

96. Powers MJ, Trent MS. 2018. Expanding the Paradigm for the Outer Membrane: Acinetobacter baumannii in the Absence of Endotoxin. Mol Microbiol 107:47–56.

97. Murray SR, Ernst RK, Bermudes D, Miller SI, Low KB. 2007. pmrA(Con) confers pmrHFIJKL-dependent EGTA and polymyxin resistance on msbB Salmonella by decorating lipid A with phosphoethanolamine. J Bacteriol 189:5161–5169.

98. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. 2009. Resistance to Colistin in Acinetobacter baumannii Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. Antimicrob Agents Chemother 53:3628–3634.

99. Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, Harper M, Boyce JD, Bou G. 2014. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 58:518–526.

100. Kamoshida G, Akaji T, Takemoto N, Suzuki Y, Sato Y, Kai D, Hibino T, Yamaguchi D, Kikuchi-Ueda T, Nishida S, Unno Y, Tansho-Nagakawa S, Ubagai T, Miyoshi-Akiyama T, Oda M, Ono Y. 2020. Lipopolysaccharide-Deficient Acinetobacter baumannii Due to Colistin Resistance Is Killed by Neutrophil-Produced Lysozyme. Front Microbiol 11:573.

101. Janssen AB, Schaik W van. 2021. Harder, better, faster, stronger: Colistin resistance mechanisms in Escherichia coli. PLOS Genetics 17:e1009262.

102. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 16:161–168.

103. Liu Y-Y, Chandler CE, Leung LM, McElheny CL, Mettus RT, Shanks RMQ, Liu J-H, Goodlett DR, Ernst RK, Doi Y. 2017. Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by mcr-1 in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. Antimicrob Agents Chemother 61:e00580-17.

104. Nang SC, Li J, Velkov T. 2019. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. Crit Rev Microbiol 45:131–161.

105. Novović K, Jovčić B. 2023. Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii: Molecular Mechanisms and Epidemiology. 3. Antibiotics 12:516.

106. Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products.

107. Antibacterial Therapies for Patients With an Unmet Medical Need for the Treatment of Serious Bacterial Diseases Guidance for Industry.

108. Derendorf H, Meibohm B. 1999. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. Pharm Res 16:176–185.

109. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. Pathogens 10:165.

110. ETEST®. bioMérieux. https://www.biomerieux-usa.com/etesterv. Retrieved 26 September 2023.

111. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. 2. Nat Protoc 3:163–175.

112. Levison ME. 2004. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. Infectious Disease Clinics of North America 18:451–465.

113. Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Emery Pharma. https://emerypharma.com/solutions/cell-microbiology-services/minimum-inhibitory-concentration/. Retrieved 26 September 2023.

114. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. 1950. The effective concentrations of penicillin in vitro and in vivo for streptococci, pneumococci, and Treponema pallidum. J Bacteriol 59:625–643.

115. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. 1950. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. Am J Med 9:280–299.

116. Eagle H, Fleischman R, Levy M. 1953. On the duration of penicillin action in relation to its concentration in the serum. J Lab Clin Med 41:122–132.

117. Friberg LE. 2021. Pivotal Role of Translation in Anti-Infective Development. Clin Pharmacol Ther 109:856–866.

118. Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, MacGowan AP, Rodloff A, Soussy C-J, Steinbakk M, Kahlmeter G. 2012. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. Clin Microbiol Infect 18:E37-45.

119. Wicha SG, Märtson A-G, Nielsen EI, Koch BCP, Friberg LE, Alffenaar J-W, Minichmayr IK, International Society of Anti-Infective Pharmacology (ISAP), the PK/PD study group of the European Society of Clinical Microbiology, Infectious Diseases (EPASG). 2021. From Therapeutic Drug Monitoring to Model-Informed Precision Dosing for Antibiotics. Clin Pharmacol Ther 109:928–941.

120. Landersdorfer CB, Nation RL. 2021. Limitations of Antibiotic MIC-Based PK-PD Metrics: Looking Back to Move Forward. Frontiers in Pharmacology 12.

121. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2011. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization ▿ . Antimicrob Agents Chemother 55:4619–4630.

122. J.S. Cadwell J. 2012. The Hollow Fiber Infection Model for Antimicrobial Pharmacodynamics and Pharmacokinetics. Adv Pharmacoepidem Drug Safety 01.

123. Louie A, VanScoy BD, Heine HS, Liu W, Abshire T, Holman K, Kulawy R, Brown DL, Drusano GL. 2012. Differential Effects of Linezolid and Ciprofloxacin on Toxin Production by Bacillus anthracis in an In Vitro Pharmacodynamic System. Antimicrob Agents Chemother 56:513–517.

124. Nielsen EI, Friberg LE. 2013. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol Rev 65:1053–1090.

125. Mouton JW, Vinks AA, Punt NC. 1997. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. Antimicrob Agents Chemother 41:733–738.

126. Meagher AK, Forrest A, Dalhoff A, Stass H, Schentag JJ. 2004. Novel pharmacokinetic-pharmacodynamic model for prediction of outcomes with an extended-release formulation of ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 48:2061–2068.

127. Bulitta JB, Ly NS, Landersdorfer CB, Wanigaratne NA, Velkov T, Yadav R, Oliver A, Martin L, Shin BS, Forrest A, Tsuji BT. 2015. Two mechanisms of killing of Pseudomonas aeruginosa by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling. Antimicrob Agents Chemother 59:2315–2327.

128. Yadav R, Bulitta JB, Nation RL, Landersdorfer CB. 2016. Optimization of Synergistic Combination Regimens against Carbapenem- and Aminoglycoside-Resistant Clinical Pseudomonas aeruginosa Isolates via Mechanism-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling. Antimicrob Agents Chemother 61:e01011-16.

129. Aranzana-Climent V, Buyck JM, Smani Y, Pachón-Diaz J, Marchand S, Couet W, Grégoire N. 2020. Semi-mechanistic PK/PD modelling of combined polymyxin B and minocycline against a polymyxin-resistant strain of Acinetobacter baumannii. Clinical Microbiology and Infection 26:1254.e9-1254.e15.

130. Tait JR, Harper M, Cortés-Lara S, Rogers KE, López-Causapé C, Smallman TR, Lang Y, Lee WL, Zhou J, Bulitta JB, Nation RL, Boyce JD, Oliver A, Landersdorfer CB. 2023. Ceftolozane-Tazobactam against Pseudomonas aeruginosa Cystic Fibrosis Clinical Isolates in the Hollow-Fiber Infection Model: Challenges Imposed by Hypermutability and Heteroresistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 67:e00414-23.

131. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, Zheng Y, Guo Y, Zhang R, Hu F, China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. 2020. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10.

132. Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era? | Open Forum Infectious Diseases | Oxford Academic. https://academic.oup.com/ofid/article/6/10/ofz368/5550895. Retrieved 24 March 2023.

133. Acheampong G, Owusu M, Owusu-Ofori A, Osei I, Sarpong N, Sylverken A, Kung H-J, Cho S-T, Kuo C-H, Park SE, Marks F, Adu-Sarkodie Y, Owusu-Dabo E. 2019. Chromosomal and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in human Salmonella enterica infection in Ghana. BMC Infectious Diseases 19:898.

134. Schuck EL, Dalhoff A, Stass H, Derendorf H. 2005. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) evaluation of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. Infection 33 Suppl 2:22–28.

135. Mohamed AF, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2012. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants. Antimicrob Agents Chemother 56:179–188.

136. Reygaert WC. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol 4:482–501.

137. Fernández L, Hancock REW. 2012. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews 25:661–681.

138. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya O, Plésiat P. 2003. MexXY-OprM Efflux Pump Is Necessary for Adaptive Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 47:1371–1375.

139. Ni RT, Onishi M, Mizusawa M, Kitagawa R, Kishino T, Matsubara F, Tsuchiya T, Kuroda T, Ogawa W. 2020. The role of RND-type efflux pumps in multidrug-resistant mutants of Klebsiella pneumoniae. 1. Sci Rep 10:10876.

140. Pacios O, Fernández-García L, Bleriot I, Blasco L, Ambroa A, López M, Ortiz-Cartagena C, González de Aledo M, Fernández-Cuenca F, Oteo-Iglesias J, Pascual Á, Martínez-Martínez L, Tomás M. 2022. Adaptation of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae to the combination of niclosamide with the efflux pump inhibitor phenyl-arginine-β-naphthylamide (PaβN): co-resistance to antimicrobials. J Antimicrob Chemother 77:1272–1281.

141. Henry R, Vithanage N, Harrison P, Seemann T, Coutts S, Moffatt JH, Nation RL, Li J, Harper M, Adler B, Boyce JD. 2012. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient Acinetobacter baumannii responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly-β-1,6-N-acetylglucosamine. Antimicrob Agents Chemother 56:59–69.

142. Boinett CJ, Cain AK, Hawkey J, Do Hoang NT, Khanh NNT, Thanh DP, Dordel J, Campbell JI, Lan NPH, Mayho M, Langridge GC, Hadfield J, Chau NVV, Thwaites GE, Parkhill J, Thomson NR, Holt KE, Baker S. 2019. Clinical and laboratory-induced colistin-resistance mechanisms in Acinetobacter baumannii. Microb Genom 5:e000246.

143. Li M. 2020. Pan-transcriptomic analysis identified common differentially expressed genes of Acinetobacter baumannii in response to polymyxin treatments.

144. Yadav R, Landersdorfer CB, Nation RL, Boyce JD, Bulitta JB. 2015. Novel approach to optimize synergistic carbapenem-aminoglycoside combinations against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 59:2286–2298.

145. Ly NS, Bulman ZP, Bulitta JB, Baron C, Rao GG, Holden PN, Li J, Sutton MD, Tsuji BT. 2016. Optimization of Polymyxin B in Combination with Doripenem To Combat Mutator Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 60:2870–2880.

146. Mohamed AF, Kristoffersson AN, Karvanen M, Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2016. Dynamic interaction of colistin and meropenem on a WT and a resistant strain of Pseudomonas aeruginosa as quantified in a PK/PD model. J Antimicrob Chemother 71:1279–1290.

147. Kristoffersson AN, Bissantz C, Okujava R, Haldimann A, Walter I, Shi T, Zampaloni C, Nielsen EI. 2020. A novel mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) model describing ceftazidime/avibactam efficacy against β-lactamase-producing Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 75:400–408.

148. Katsube T, Yamano Y, Yano Y. 2008. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling and Simulation for in Vivo Bactericidal Effect in Murine Infection Model. JPharmSci 97:1606–1614.

149. 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? 6. J Antibiot 64:439–446.

150. Khan DD, Friberg LE, Nielsen EI. 2016. A pharmacokinetic-pharmacodynamic (PKPD) model based on in vitro time-kill data predicts the in vivo PK/PD index of colistin. J Antimicrob Chemother 71:1881–1884.

151. Lin Y-W, Zhou QT, Han M-L, Onufrak NJ, Chen K, Wang J, Forrest A, Chan H-K, Li J. 2018. Mechanism-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Aerosolized Colistin in a Mouse Lung Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62:e01965-17.

152. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Beaudoin M-E, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2018. A mathematical model-based analysis of the time–kill kinetics of ceftazidime/avibactam against Pseudomonas aeruginosa. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73:1295–1304.

153. Sou T, Hansen J, Liepinsh E, Backlund M, Ercan O, Grinberga S, Cao S, Giachou P, Petersson A, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, Vingsbo Lundberg C, Hughes D, Hobbie SN, Friberg LE. 2021. Model-Informed Drug Development for Antimicrobials: Translational PK and PK/PD Modeling to Predict an Efficacious Human Dose for Apramycin. Clin Pharmacol Ther 109:1063–1073.

154. Chauzy A, Akrong G, Aranzana-Climent V, Moreau J, Prouvensier L, Mirfendereski H, Buyck JM, Couet W, Marchand S. 2022. PKPD Modeling of the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B in vivo. Front Pharmacol 13:842921.

155. Aranzana-Climent V, Hughes D, Cao S, Tomczak M, Urbas M, Zabicka D, Lundberg CV, Hansen J, Lindberg J, Hobbie SN, Friberg LE. 2022. Translational in vitro and in vivo PKPD modelling for apramycin against Gram-negative lung pathogens to facilitate prediction of human efficacious dose in pneumonia. Clinical Microbiology and Infection 28:1367–1374.

156. Mueller JH, Hinton J. 1941. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. Experimental Biology and Medicine 48:330–333.

157. 70192dat.pdf.

158. Mueller Hinton Agar/broth Antimicrobial Susceptibility Test Culture Media FDA Classification, Life Cycle Events [3369]. https://fda.report/Product-Code/deviceId/3369. Retrieved 6 February 2023.

159. M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. Clinical & Laboratory Standards Institute. https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/. Retrieved 7 March 2023.

160. Media_preparation_v_7.0_EUCAST_AST_2022.pdf.

161. Schwameis R, Fille M, Manafi M, Zeitlinger M, Sauermann R. 2012. Enhanced activity of linezolid against Staphylococcus aureus in cerebrospinal fluid. Res Microbiol 163:157–160.

162. Kussmann M, Schuster L, Zeitlinger M, Pichler P, Reznicek G, Wiesholzer M, Burgmann H, Poeppl W. 2015. The influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of ampicillin, daptomycin, and linezolid against Enterococcus faecalis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 34:2257–2263.

163. Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, Zeitlinger M, Wiesholzer M. 2018. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 37:1091–1098.

164. Bren A, Hart Y, Dekel E, Koster D, Alon U. 2013. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. BMC Systems Biology 7:27.

165. 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.

166. Hartmann A, Braun V. 1981. Iron uptake and iron limited growth of Escherichia coli K-12. Arch Microbiol 130:353–356.

167. Chen T, Dong G, Zhang S, Zhang X, Zhao Y, Cao J, Zhou T, Wu Q. 2020. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of Klebsiella pneumoniae causing liver abscess. BMC Microbiology 20:36.

168. Eales BM, Bai B, Merlau PR, Tam VH. 2023. Growth of Acinetobacter baumannii impacted by iron chelation. Lett Appl Microbiol 76:ovad019.

169. Schaechter M, Maaloe O, Kjeldgaard NO. 1958. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of Salmonella typhimurium. J Gen Microbiol 19:592–606.

170. Tempest DW, Ellwood DC. 1969. The influence of growth conditions on the composition of some cell wall components of Aerobacter aerogenes. Biotechnology and Bioengineering 11:775–783.

171. Domingue GJ, Schlegel JU. 1970. The possible role of microbial L-forms in pyelonephritis. J Urol 104:790–798.

172. Holme T. 1972. Influence of environment on the content and composition of bacterial envelopes. Journal of Applied Chemistry and Biotechnology 22:391–399.

173. Steinberger RE, Allen AR, Hansma HG, Holden PA. 2002. Elongation Correlates with Nutrient Deprivation in Pseudomonas aeruginosa-Unsaturated Biofilms. Microbial Ecology 43:416–423.

174. Ghanbari A, Dehghany J, Schwebs T, Müsken M, Häussler S, Meyer-Hermann M. 2016. Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. 1. Sci Rep 6:32097.

175. Finch JE, Brown MR. 1975. The influence of nutrient limitation in a chemostat on the sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to polymyxin and to EDTA. J Antimicrob Chemother 1:379–386.

176. Lugtenberg B, Peters R, Bernheimer H, Berendsen W. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of Escherichia coli. Mol Gen Genet 147:251–262.

177. Gilbert P, Brown MR. 1978. Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of Pseudomonas aeruginosa and its resistance to 3- and 4-chlorophenol. J Bacteriol 133:1066–1072.

178. Sterkenburg A, Vlegels E, Wouters JTM. 1984. Influence of Nutrient Limitation and Growth Rate on the Outer Membrane Proteins of Klebsiella aerogenes NCTC 418. Microbiology 130:2347–2355.

179. Wick LM, Quadroni M, Egli T. 2001. Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of Escherichia coli during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. Environmental Microbiology 3:588–599.

180. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. 2003. Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in Klebsiella pneumoniae Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47:1251–1256.

181. Hua Q, Yang C, Oshima T, Mori H, Shimizu K. 2004. Analysis of Gene Expression in Escherichia coli in Response to Changes of Growth-Limiting Nutrient in Chemostat Cultures. Applied and Environmental Microbiology 70:2354–2366.

182. Sukmarini L, Shimizu K. 2010. Metabolic regulation of Escherichia coli and its glnG and zwf mutants under nitrogen limitation. Biochemical Engineering Journal 48:230–236.

183. Egwuatu TO, Ogunsola FT, Okodugha IM, Jide B, Arewa DG, Osinupebi OA. 2014. Effect of Blood Agar from Different Animal Blood on Growth Rates and Morphology of Common Pathogenic Bacteria. 16. Advances in Microbiology 04:1237.

184. Folsom JP, Carlson RP. 2015. Physiological, biomass elemental composition and proteomic analyses of Escherichia coli ammonium-limited chemostat growth, and comparison with iron- and glucose-limited chemostat growth. Microbiology 161:1659.

185. Li Z, Pan Q, Xiao Y, Fang X, Shi R, Fu C, Danchin A, You C. 2018. Deciphering global gene expression and regulation strategy in Escherichia coli during carbon limitation. Microb Biotechnol 12:360–376.

186. Lugtenberg B, Peters R, Bernheimer H, Berendsen W. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins ofEscherichia coli. Molec Gen Genet 147:251–262.

187. Liu X, Ferenci T. 1998. Regulation of Porin-Mediated Outer Membrane Permeability by Nutrient Limitation in Escherichia coli. Journal of Bacteriology 180:3917–3922.

188. Löffler M, Simen JD, Müller J, Jäger G, Laghrami S, Schäferhoff K, Freund A, Takors R. 2017. Switching between nitrogen and glucose limitation: Unraveling transcriptional dynamics in Escherichia coli. Journal of Biotechnology 258:2–12.

189. Warsi OM, Andersson DI, Dykhuizen DE. 2018. Different adaptive strategies in E. coli populations evolving under macronutrient limitation and metal ion limitation. BMC Evol Biol 18:72.

190. KENWARD MA, BROWN MRW, FRYER JJ. 1979. The Influence of Calcium or Manganese on the Resistance to EDTA, Polymyxin B or Cold Shock, and the Composition of Pseudomonas aeruginosa Grown in Glucose- or Magnesium-depleted Batch Cultures. Journal of Applied Bacteriology 47:489–503.

191. Buurman ET, Boiardi JL, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. 1990. The role of magnesium and calcium ions in the glucose dehydrogenase activity of Klebsiella pneumoniae NCTC 418. Arch Microbiol 153:502–505.

192. Patrauchan MA, Sarkisova SA, Franklin MJ. 2007. Strain-specific proteome responses of Pseudomonas aeruginosa to biofilm-associated growth and to calcium. Microbiology 153:3838–3851.

193. Horsman SR, Moore RA, Lewenza S. 2012. Calcium Chelation by Alginate Activates the Type III Secretion System in Mucoid Pseudomonas aeruginosa Biofilms. PLOS ONE 7:e46826.

194. Ombaka EA, Cozens RM, Brown MR. 1983. Influence of nutrient limitation of growth on stability and production of virulence factors of mucoid and nonmucoid strains of Pseudomonas aeruginosa. Rev Infect Dis 5 Suppl 5:S880-888.

195. Turnowsky F, Brown MRW, Anwar H, Lambert PA. 1983. Effect of iron limitation of growth rate on the binding of penicillin G to the penicillin binding proteins of mucoid and non-mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiology Letters 17:243–245.

196. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. 2011. Investigation of the human pathogen Acinetobacter baumannii under iron limiting conditions. BMC Genomics 12:126.

197. Lim CK, Hassan KA, Tetu SG, Loper JE, Paulsen IT. 2012. The effect of iron limitation on the transcriptome and proteome of Pseudomonas fluorescens Pf-5. PLoS One 7:e39139.

198. Brown MR, Melling J. 1969. Loss of sensitivity to EDTA by Pseudomonas aeruginosa grown under conditions of Mg limitation. J Gen Microbiol 55:xi.

199. Günther T, Richter L, Schmalbeck J. 1975. Phospholipids of Escherichia coli in magnesium deficiency. J Gen Microbiol 86:191–193.

200. Minnikin DE, Abdolrahimzadeh H, Baddiley J. 1974. Replacement of acidic phosphates by acidic glycolipids in Pseudomonas diminuta. Nature 249:268–269.

201. Guina T, Purvine SO, Yi EC, Eng J, Goodlett DR, Aebersold R, Miller SI. 2003. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis airways. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:2771–2776.

202. Guina T, Wu M, Miller SI, Purvine SO, Yi EC, Eng J, Goodlett DR, Aebersold R, Ernst RK, Lee KA. 2003. Proteomic analysis of Pseudomonas aeruginosa grown under magnesium limitation. J Am Soc Mass Spectrom 14:742–751.

203. Overbeeke N, Lugtenberg B. 1980. Expression of outer membrane protein e of Escherichia coli K12 by phosphate limitation. FEBS Lett 112:229–232.

204. Clarke KG, Ballot F, Reid SJ. 2010. Enhanced rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa under phosphate limitation. World J Microbiol Biotechnol 26:2179–2184.

205. Behrends V, Maharjan RP, Ryall B, Feng L, Liu B, Wang L, Bundy JG, Ferenci T. 2014. A metabolic trade-off between phosphate and glucose utilization in Escherichia coli. Mol BioSyst 10:2820–2822.

206. Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2021. The Rhl Quorum-Sensing System Is at the Top of the Regulatory Hierarchy under Phosphate-Limiting Conditions in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Journal of Bacteriology 203:10.1128/jb.00475-20.

207. Matilla MA, Udaondo Z, Maaß S, Becher D, Krell T. 2022. Virulence Induction in Pseudomonas aeruginosa under Inorganic Phosphate Limitation: a Proteomics Perspective. Microbiology Spectrum 10:e02590-22.

208. Ziervogel BK, Roux B. 2013. The Binding of Antibiotics in OmpF Porin. Structure 21:76–87.

209. Choi U, Lee C-R. 2019. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in Escherichia coli. Frontiers in Microbiology 10.

210. Chetri S, Singha M, Bhowmik D, Nath K, Chanda DD, Chakravarty A, Bhattacharjee A. 2019. Transcriptional response of OmpC and OmpF in Escherichia coli against differential gradient of carbapenem stress. BMC Research Notes 12:138.

211. Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_201217.pdf.

212. Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, Yoshizawa H, Sato T, Nakamura R, Tsuji M, Yamano Y. 2016. Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for

Antibacterial Activity against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 60:7396–7401.

213. Bradford PA, Petersen PJ, Young M, Jones CH, Tischler M, O'Connell J. 2005. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. Antimicrob Agents Chemother 49:3903–3909.

214. Brown DFJ, Canton R, MacGowan AP, Mouton JW, Rodloff A, Goldstein F, Odenholt I, Steinbakk M, Varaldo P, Hryniewicz W, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Steering Committee, Kahlmeter G. 2006. EUCAST Technical Note on tigecycline. Clinical Microbiology and Infection 12:1147–1149.

215. Cozens RM, Tuomanen E, Tosch W, Zak O, Suter J, Tomasz A. 1986. Evaluation of the bactericidal activity of beta-lactam antibiotics on slowly growing bacteria cultured in the chemostat. Antimicrob Agents Chemother 29:797–802.

216. Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A. 1986. The rate of killing of Escherichia coli by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. J Gen Microbiol 132:1297–1304.

217. Lee AJ, Wang S, Meredith HR, Zhuang B, Dai Z, You L. 2018. Robust, linear correlations between growth rates and β-lactam–mediated lysis rates. Proceedings of the National Academy of Sciences 115:4069–4074.

218. Dalhoff A, Matutat S, Ullmann U. 1995. Effect of quinolones against slowly growing bacteria. Chemotherapy 41:92–99.

219. Reimer LG, Stratton CW, Reller LB. 1981. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. Antimicrob Agents Chemother 19:1050–1055.

220. Kaplan N, Awrey D, Bardouniotis E, Berman J, Yethon J, Pauls HW, Hafkin B. 2013. In vitro activity (MICs and rate of kill) of AFN-1252, a novel FabI inhibitor, in the presence of serum and in combination with other antibiotics. J Chemother 25:18–25.

221. Ledger EVK, Mesnage S, Edwards AM. 2022. Human serum triggers antibiotic tolerance in Staphylococcus aureus. 1. Nat Commun 13:2041.

222. Beer J, Wagner CC, Zeitlinger M. 2009. Protein Binding of Antimicrobials: Methods for Quantification and for Investigation of its Impact on Bacterial Killing. AAPS J 11:1.

223. Dutcher BS, Reynard AM, Beck ME, Cunningham RK. 1978. Potentiation of Antibiotic Bactericidal Activity by Normal Human Serum. Antimicrob Agents Chemother 13:820–826.

224. Traub WH, Sherris JC. 2009. Studies on the Interaction Between Serum Bactericidal Activity and Antibiotics in vitro. Chemotherapy 15:70–83.

225. Ghobrial O, Derendorf H, Hillman JD. 2010. Human serum binding and its effect on the pharmacodynamics of the lantibiotic MU1140. Eur J Pharm Sci 41:658–664.

226. Nix DE, Matthias KR, Ferguson EC. 2004. Effect of ertapenem protein binding on killing of bacteria. Antimicrob Agents Chemother 48:3419–3424.

227. Magda M, Bettoni S, Laabei M, Fairley D, Russo TA, Riesbeck K, Blom AM. 2022. Clinical Isolates of Acinetobacter spp. Are Highly Serum Resistant Despite Efficient Recognition by the Complement System. Frontiers in Immunology 13.

228. Hennessen F, Miethke M, Zaburannyi N, Loose M, Lukežič T, Bernecker S, Hüttel S, Jansen R, Schmiedel J, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Vogel J, Westermann AJ, Hesterkamp T, Stadler M, Wagenlehner F, Petković H, Herrmann J, Müller R. 2020. Amidochelocardin Overcomes Resistance Mechanisms Exerted on Tetracyclines and Natural Chelocardin. Antibiotics (Basel) 9:619.

229. Kussmann M, Hauer S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, Zeitlinger M, Wiesholzer M. 2018. Influence of different peritoneal dialysis fluids on the in vitro activity of fosfomycin against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 37:1091–1098.

230. Kussmann M, Schuster L, Wrenger S, Pichler P, Reznicek G, Burgmann H, Poeppl W, Zeitlinger M, Wiesholzer M. 2016. Influence of Different Peritoneal Dialysis Fluids on the In Vitro Activity of Cefepime, Ciprofloxacin, Ertapenem, Meropenem and Tobramycin Against Escherichia Coli. Perit Dial Int 36:662–668.

231. Keemink J, Cantrill C, Riboulet W, Jurmanović S, Pavlovski I, Bissantz C. 2023. Estimating Unbound Drug Concentrations in Simulated Human Lung Fluid: Relevance to Lung Antibiotic PKPD. Mol Pharmaceutics https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00208.

232. Schindler M, Osborn MJ. 1979. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. Biochemistry 18:4425–4430.

233. Moore RA, Bates NC, Hancock RE. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob Agents Chemother 29:496–500.

234. 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.

235. Andrews WH, Magee LA. 1973. Divalent Cation Reversal of Tetracycline-Inhibited Respiration of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 3:645–646.

236. Fass RJ, Barnishan J. 1979. Effect of Divalent Cation Concentrations on the Antibiotic Susceptibilities of Nonfermenters Other than Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 16:434.

237. Deitchman AN, Singh RSP, Rand KH, Derendorf H. 2018. Enhanced in Vitro Tigecycline Activity in the Presence of Chelating Agents. Int J Antimicrob Agents 51:799–802.

238. Walter EJ, Hanna-Jumma S, Carraretto M, Forni L. 2016. The pathophysiological basis and consequences of fever. Critical Care 20:200.

239. Ahkee S, Srinath L, Ramirez J. 1997. Community-acquired pneumonia in the elderly: association of mortality with lack of fever and leukocytosis. South Med J 90:296–298.

240. Lee BH, Inui D, Suh GY, Kim JY, Kwon JY, Park J, Tada K, Tanaka K, Ietsugu K, Uehara K, Dote K, Tajimi K, Morita K, Matsuo K, Hoshino K, Hosokawa K, Lee KH, Lee KM, Takatori M, Nishimura M, Sanui M, Ito M, Egi M, Honda N, Okayama N, Shime N, Tsuruta R, Nogami S, Yoon S-H, Fujitani S, Koh SO, Takeda S, Saito S, Hong SJ, Yamamoto T, Yokoyama T, Yamaguchi T, Nishiyama T, Igarashi T, Kakihana Y, Koh Y, Fever and Antipyretic in Critically ill patients Evaluation (FACE) Study Group. 2012. Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis: multi-centered prospective observational study. Crit Care 16:R33.

241. Young PJ, Saxena M, Beasley R, Bellomo R, Bailey M, Pilcher D, Finfer S, Harrison D, Myburgh J, Rowan K. 2012. Early peak temperature and mortality in critically ill patients with or without infection. Intensive Care Med 38:437–444.

242. Cotner JB, Makino W, Biddanda BA. 2006. Temperature Affects Stoichiometry and Biochemical Composition of Escherichia coli. Microb Ecol 52:26–33.

243. Chrzanowski TH, Grover JP. 2008. Element content of Pseudomonas fluorescens varies with growth rate and temperature: A replicated chemostat study addressing ecological stoichiometry. Limnology and Oceanography 53:1242–1251.

244. Kumar P, Libchaber A. 2013. Pressure and Temperature Dependence of Growth and Morphology of Escherichia coli: Experiments and Stochastic Model. Biophys J 105:783–793.

245. Hodate K, Bito Y. 1982. Temperature dependence of bactericidal action of polymyxin B. Microbiol Immunol 26:737–740.

246. Mackowiak PA, Marling-Cason M, Cohen RL. 1982. Effects of temperature on antimicrobial susceptibility of bacteria. J Infect Dis 145:550–553.

247. Anwar H, Brown MR, Lambert PA. 1983. Effect of nutrient depletion on sensitivity of Pseudomonas cepacia to phagocytosis and serum bactericidal activity at different temperatures. J Gen Microbiol 129:2021–2027.

248. Hasday JD, Garrison A, Singh IS, Standiford T, Ellis GS, Rao S, He J-R, Rice P, Frank M, Goldblum SE, Viscardi RM. 2003. Febrile-range hyperthermia augments pulmonary neutrophil recruitment and amplifies pulmonary oxygen toxicity. Am J Pathol 162:2005–2017.

249. Marr AG, Ingraham JL. 1962. EFFECT OF TEMPERATURE ON THE COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN ESCHERICHIA COLI. J Bacteriol 84:1260–1267.

250. Haest CW, de Gier J, van Deenen LL. 1969. Changes in the chemical and the barrier properties of the membrane lipids of E. coli by variation of the temperature of growth. Chem Phys Lipids 3:413–417.

251. Lugtenberg EJ, Peters R. 1976. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli K12. Biochim Biophys Acta 441:38–47.

252. Okuyama H, Yamada K, Kameyama Y, Ikezawa H, Akamatsu Y, Nojima S. 1977. Regulation of membrane lipid synthesis in Escherichia coli after shifts in temperature. Biochemistry 16:2668–2673.

253. Ishinaga M, Kanamoto R, Kito M. 1979. Distribution of phospholipid molecular species in outer and cytoplasmic membrane of Escherichia coli. J Biochem 86:161–165.

254. Nakayama H, Mitsui T, Nishihara M, Kito M. 1980. Relation between growth temperature of E. coli and phase transition temperatures of its cytoplasmic and outer membranes. Biochim Biophys Acta 601:1–10.

255. Casadei MA, Mañas P, Niven G, Needs E, Mackey BM. 2002. Role of Membrane Fluidity in Pressure Resistance of Escherichia coli NCTC 8164. Applied and Environmental Microbiology 68:5965–5972.

256. Begic S, Worobec EA. 2006. Regulation of Serratia marcescens ompF and ompC porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. Microbiology 152:485–491.

257. Bazyleu A, Kumar A. 2014. Incubation temperature, osmolarity, and salicylate affect the expression of resistance–nodulation–division efflux pumps and outer membrane porins in Acinetobacter baumanniiATCC19606T. FEMS Microbiology Letters 357:136–143.

258. Wicha SG, Kloft C. 2016. Simultaneous determination and stability studies of linezolid, meropenem and vancomycin in bacterial growth medium by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1028:242–248.

259. Yadav R, Bulitta JB, Schneider EK, Shin BS, Velkov T, Nation RL, Landersdorfer CB. 2017. Aminoglycoside Concentrations Required for Synergy with Carbapenems against Pseudomonas aeruginosa Determined via Mechanistic Studies and Modeling. Antimicrob Agents Chemother 61:e00722-17.

260. André AC, Debande L, Marteyn BS. 2021. The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection. Cellular Microbiology 23:e13338.

261. Schobert M, Jahn D. 2010. Anaerobic physiology of Pseudomonas aeruginosa in the cystic fibrosis lung. Int J Med Microbiol 300:549–556.

262. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ. 2002. Pseudomonas aeruginosa anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. Dev Cell 3:593–603.

263. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407:762–764.

264. Eltzschig HK, Carmeliet P. 2011. Hypoxia and Inflammation. N Engl J Med 364:656–665.

265. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. J Clin Invest 109:317–325.

266. Ni Bhriain N, Dorman CJ, Higgins CF. 1989. An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. Mol Microbiol 3:933–942.

267. Virtanen S. 1974. Antibacterial activity of sulphamethoxazole and trimethoprim under diminished oxygen tension. J Gen Microbiol 84:145–148.

268. Muhvich KH, Park MK, Myers RA, Marzella L. 1989. Hyperoxia and the antimicrobial susceptibility of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 33:1526–1530.

269. Reynolds AV, Hamilton-Miller JM, Brumfitt W. 1976. Diminished effect of gentamicin under anaerobic or hypercapnic conditions. Lancet 1:447–449.

270. Tack KJ, Sabath LD. 1985. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. Chemotherapy 31:204–210.

271. Davey P, Barza M, Stuart M. 1988. Tolerance of Pseudomonas aeruginosa to killing by ciprofloxacin, gentamicin and imipenem in vitro and in vivo. J Antimicrob Chemother 21:395–404.

272. Bryant RE, Fox K, Oh G, Morthland VH. 1992. Beta-lactam enhancement of aminoglycoside activity under conditions of reduced pH and oxygen tension that may exist in infected tissues. J Infect Dis 165:676–682.

273. Oie S, Kawakami M, Kamiya A, Tomita M. 2002. In vitro susceptibility of four serotypes of enterohaemorrhagic Escherichia coli to antimicrobial agents. Biol Pharm Bull 25:671–673.

274. Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM. 2005. Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa grown planktonically and as biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24:677–687.

275. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, Chan CTY, Lobritz MA, Braff D, Schwarz EG, Ye JD, Pati M, Vercruysse M, Ralifo PS, Allison KR, Khalil AS, Ting AY, Walker GC, Collins JJ. 2014. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences 111:E2100–E2109.

276. Gupta S, Laskar N, Kadouri DE. 2016. Evaluating the Effect of Oxygen Concentrations on Antibiotic Sensitivity, Growth, and Biofilm Formation of Human Pathogens. Microbiol Insights 9:37–46.

277. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). Ann N Y Acad Sci 235:364–386.

278. Lemieux MJ, Huang Y, Wang D-N. 2004. The structural basis of substrate translocation by the Escherichia coli glycerol-3-phosphate transporter: a member of the major facilitator superfamily. Curr Opin Struct Biol 14:405–412.

279. Kurabayashi K, Tanimoto K, Fueki S, Tomita H, Hirakawa H. 2015. Elevated Expression of GlpT and UhpT via FNR Activation Contributes to Increased Fosfomycin Susceptibility in Escherichia coli under Anaerobic Conditions. Antimicrob Agents Chemother 59:6352–6360.

280. Hirakawa H, Kurabayashi K, Tanimoto K, Tomita H. 2018. Oxygen Limitation Enhances the Antimicrobial Activity of Fosfomycin in Pseudomonas aeruginosa Following Overexpression of glpT Which Encodes Glycerol-3-Phosphate/Fosfomycin Symporter. Front Microbiol 9:1950.

281. Inouye S, Watanabe T, Tsuruoka T, Kitasato I. 1989. An increase in the antimicrobial activity in vitro of fosfomycin under anaerobic conditions. J Antimicrob Chemother 24:657–666.

282. Hu J, Zhang J, Chen Y, Liang W, Wu S. 2017. In Vitro Anaerobic Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model to Simulate the Bactericidal Activity of Levornidazole Against Bacteroides fragilis. Clin Ther 39:828–836.

283. Rumbaugh KP, Sauer K. 2020. Biofilm dispersion. Nat Rev Microbiol 18:571–586.

284. Wi YM, Patel R. 2018. Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. Infect Dis Clin North Am 32:915–929.

285. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2:95–108.

286. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP. 2018. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. Clinical Microbiology Reviews 31:10.1128/cmr.00084-16.

287. Bester E, Wolfaardt GM, Aznaveh NB, Greener J. 2013. Biofilms' role in planktonic cell proliferation. Int J Mol Sci 14:21965–21982.

288. Chua SL, Liu Y, Yam JKH, Chen Y, Vejborg RM, Tan BGC, Kjelleberg S, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Yang L. 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. 1. Nat Commun 5:4462.

289. Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, Rodríguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomás M, Bou G, Poza M. 2013. Whole Transcriptome Analysis of Acinetobacter baumannii Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. PLoS One 8:e72968.

290. D'Arpa P, Karna SLR, Chen T, Leung KP. 2021. Pseudomonas aeruginosa transcriptome adaptations from colonization to biofilm infection of skin wounds. 1. Sci Rep 11:20632.

291. Guzmán-Soto I, McTiernan C, Gonzalez-Gomez M, Ross A, Gupta K, Suuronen EJ, Mah T-F, Griffith M, Alarcon EI. 2021. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. iScience 24:102443.

292. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. J Clin Microbiol 37:1771–1776.

293. Barber KE, Werth BJ, McRoberts JP, Rybak MJ. 2014. A Novel Approach Utilizing Biofilm Time-Kill Curves To Assess the Bactericidal Activity of Ceftaroline Combinations against Biofilm-Producing Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 58:2989–2992.

294. Barber KE, Shammout Z, Smith JR, Kebriaei R, Morrisette T, Rybak MJ. 2021. Biofilm Time-Kill Curves to Assess the Bactericidal Activity of Daptomycin Combinations against Biofilm-Producing Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium and faecalis. Antibiotics (Basel) 10:897.

295. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain P-L, Woehrlé F, El Garch F, Bousquet-Melou A, Ferran AA. 2018. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing Staphylococcus aureus Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. Front Microbiol 9:572.

296. Gómez-Junyent J, Murillo O, Yu HH, Azad MAK, Wickremasinghe H, Rigo-Bonnin R, Benavent E, Ariza J, Li J. 2021. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of continuous ceftazidime infusion alone and in combination with colistin against Pseudomonas aeruginosa biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents 57:106246.

297. Hengzhuang W, Høiby N, Ciofu O. 2014. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibiotics in Biofilm Infections of Pseudomonas aeruginosa In Vitro and In Vivo, p. 239–254. *In* Donelli, G (ed.), Microbial Biofilms: Methods and Protocols. Springer, New York, NY.

298. 2017. Biofilms. American Scientist. https://www.americanscientist.org/article/biofilms. Retrieved 9 October 2023.

299. Zhi J, Nightingale CH, Quintiliani R. 1986. A pharmacodynamic model for the activity of antibiotics against microorganisms under nonsaturable conditions. J Pharm Sci 75:1063–1067.

300. Yano Y, Oguma T, Nagata H, Sasaki S. 1998. Application of logistic growth model to pharmacodynamic analysis of in vitro bactericidal kinetics. J Pharm Sci 87:1177–1183.

301. 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. Antimicrob Agents Chemother 51:128–136.

302. Khan DD, Lagerbäck P, Cao S, Lustig U, Nielsen EI, Cars O, Hughes D, Andersson DI, Friberg LE. 2015. A mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model allows prediction of antibiotic killing from MIC values for WT and mutants. J Antimicrob Chemother 70:3051–3060.

303. Zhuang L, He Y, Xia H, Liu Y, Sy SKB, Derendorf H. 2016. Gentamicin dosing strategy in patients with end-stage renal disease receiving haemodialysis: evaluation using a semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71:1012–1021.

304. Ungphakorn W, Tängdén T, Sandegren L, Nielsen EI. 2016. A pharmacokinetic–pharmacodynamic model characterizing the emergence of resistant Escherichia coli subpopulations during ertapenem exposure. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71:2521–2533.

305. Sadiq MW, Nielsen EI, Khachman D, Conil J-M, Georges B, Houin G, Laffont CM, Karlsson MO, Friberg LE. 2017. A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. J Pharmacokinet Pharmacodyn 44:69–79.

306. Sy SKB, Zhuang L, Xia H, Schuck VJ, Nichols WW, Derendorf H. 2019. A model-based analysis of pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) indices of avibactam against Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 25:904.e9-904.e16.

307. Thorsted A, Tano E, Kaivonen K, Sjölin J, Friberg LE, Nielsen EI. 2020. Extension of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Time-Kill Studies To Include Lipopolysaccharide/Endotoxin Release from Escherichia coli Exposed to Cefuroxime. Antimicrob Agents Chemother 64:e02070-19.

308. Sou T, Kukavica-Ibrulj I, Levesque RC, Friberg LE, Bergström CAS. 2020. Model-Informed Drug Development in Pulmonary Delivery: Semimechanistic Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling for Evaluation of Treatments against Chronic Pseudomonas aeruginosa Lung Infections. Mol Pharm 17:1458–1469.

309. 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:fnaa012.

310. Shigemura K, Arakawa S, Tanaka K, Fujisawa M. 2009. Clinical investigation of isolated bacteria from urinary tracts of hospitalized patients and their susceptibilities to antibiotics. J Infect Chemother 15:18–22.

311. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, Hill AT, Templeton KE. 2015. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. Clin Microbiol Infect 21:788.e1-788.e13.

312. Kim SY, Park Y, Kim H, Kim J, Koo SH, Kwon GC. 2018. Rapid Screening of Urinary Tract Infection and Discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Automated Flow Cytometric Analysis Using Sysmex UF-5000. J Clin Microbiol 56:e02004-17.

313. Corrado ML, Landesman SH, Cherubin CE. 1980. Influence of inoculum size on activity of cefoperazone, cefotaxime, moxalactam, piperacillin, and N-formimidoyl thienamycin (MK0787) against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 18:893–896.

314. Fass RJ. 1983. In vitro activity of ciprofloxacin (Bay o 9867). Antimicrob Agents Chemother 24:568–574.

315. Eng RH, Smith SM, Cherubin C. 1984. Inoculum effect of new beta-lactam antibiotics on Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 26:42–47.

316. Fung-Tomc J, Dougherty TJ, DeOrio FJ, Simich-Jacobson V, Kessler RE. 1989. Activity of cefepime against ceftazidime- and cefotaxime-resistant gram-negative bacteria and its relationship to beta-lactamase levels. Antimicrob Agents Chemother 33:498–502.

317. Brook I. 1989. Inoculum effect. Rev Infect Dis 11:361–368.

318. Soriano F, Ponte C, Santamaria M, Jimenez-Arriero M. 1990. Relevance of the inoculum effect of antibiotics in the outcome of experimental infections caused by Escherichia coli. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 25:621–627.

319. Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahm DF. 1995. In vitro activities of various beta-lactam antimicrobial agents against clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. resistant to oxyimino cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 39:1187–1190.

320. 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.

321. Segatore B, Setacci D, Perilli M, Franchino L, Franceschini N, Agnifili A, Rossolini GM, Amicosante G. 2004. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Enterobacteriaceae producing complex beta-lactamase patterns including extended-spectrum enzymes. Int J Antimicrob Agents 23:480–486.

322. Wu N, Chen BY, Tian SF, Chu YZ. 2014. The inoculum effect of antibiotics against CTX-M-extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli. Ann Clin Microbiol Antimicrob 13:45.

323. Kang C-I, Cha MK, Kim SH, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Lee NY, Song J-H. 2014. Extended-spectrum cephalosporins and the inoculum effect in tests with CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli: potential clinical implications of the revised CLSI interpretive criteria. Int J Antimicrob Agents 43:456–459.

324. Davey PG, Barza M. 1987. The inoculum effect with gram-negative bacteria in vitro and in vivo. J Antimicrob Chemother 20:639–644.

325. Goldstein EJ, Citron DM, Cherubin CE. 1991. Comparison of the inoculum effect of cefoxitin and other cephalosporins and of beta-lactamase inhibitors and their penicillin-derived components on the Bacteroides fragilis group. Antimicrob Agents Chemother 35:1868–1874.

326. Johnson CC, Livornese L, Gold MJ, Pitsakis PG, Taylor S, Levison ME. 1995. Activity of cefepime against ceftazidime-resistant gram-negative bacilli using low and high inocula. J Antimicrob Chemother 35:765–773.

327. 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. Clinical Microbiology and Infection 7:626–635.

328. Szabó D, Máthé A, Filetóth Z, Anderlik P, Rókusz L, Rozgonyi F. 2001. In vitro and in vivo activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae strain. Antimicrob Agents Chemother 45:1287–1291.

329. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. 2004. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing

Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. J Clin Microbiol 42:269–275.

330. Burgess DS, Hall RG. 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 49:41–46.

331. Ferran A, Dupouy V, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. 2007. Influence of Inoculum Size on the Selection of Resistant Mutants of Escherichia coli in Relation to Mutant Prevention Concentrations of Marbofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 51:4163–4166.

332. Tam VH, Ledesma KR, Chang K-T, Wang T-Y, Quinn JP. 2009. Killing of Escherichia coli by β-lactams at different inocula. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 64:166–171.

333. Bhagunde P, Chang K-T, Singh R, Singh V, Garey KW, Nikolaou M, Tam VH. 2010. Mathematical Modeling To Characterize the Inoculum Effect. Antimicrob Agents Chemother 54:4739–4743.

334. 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.

335. Bergen PJ, Forrest A, Bulitta JB, Tsuji BT, Sidjabat HE, Paterson DL, Li J, Nation RL. 2011. Clinically relevant plasma concentrations of colistin in combination with imipenem enhance pharmacodynamic activity against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa at multiple inocula. Antimicrob Agents Chemother 55:5134–5142.

336. Hengzhuang W, Ciofu O, Yang L, Wu H, Song Z, Oliver A, Høiby N. 2013. High β-lactamase levels change the pharmacodynamics of β-lactam antibiotics in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Antimicrob Agents Chemother 57:196–204.

337. 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:O831-839.

338. Lenhard JR, Gall JS, Bulitta JB, Thamlikitkul V, Landersdorfer CB, Forrest A, Nation RL, Li J, Tsuji BT. 2016. Comparative pharmacodynamics of four different carbapenems in combination with polymyxin B against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents 48:719–724.

339. 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.

340. Akrong G, Chauzy A, Aranzana-Climent V, Lacroix M, Deroche L, Prouvensier L, Buyck JM, Couet W, Marchand S. 2022. A New Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model To Characterize the Inoculum Effect of Acinetobacter baumannii on Polymyxin B In Vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 66:e01789-21.

341. 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.

342. Bergen PJ, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Jacob J, Sidjabat HE, Paterson DL, Nation RL, Li J. 2011. Synergistic killing of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa at multiple inocula by colistin

combined with doripenem in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother 55:5685–5695.

343. Drusano GL, Bonomo RA, Bahniuk N, Bulitta JB, Vanscoy B, Defiglio H, Fikes S, Brown D, Drawz SM, Kulawy R, Louie A. 2012. Resistance emergence mechanism and mechanism of resistance suppression by tobramycin for cefepime for Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 56:231–242.

344. 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.

345. Eagle H. 1949. The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and Treponema pallidum. J Exp Med 90:595–607.

346. Soriano F, Santamaría M, Ponte C, Castilla C, Fernández-Roblas R. 1988. In vivo significance of the inoculum effect of antibiotics on Escherichia coli. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7:410–412.

347. 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.

348. 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.

349. DeRyke CA, Banevicius MA, Fan HW, Nicolau DP. 2007. Bactericidal activities of meropenem and ertapenem against extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a neutropenic mouse thigh model. Antimicrob Agents Chemother 51:1481–1486.

350. 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.

351. Docobo-Pérez F, López-Cerero L, López-Rojas R, Egea P, Domínguez-Herrera J, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Pachón J. 2013. Inoculum effect on the efficacies of amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, and imipenem against extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing Escherichia coli in an experimental murine sepsis model. Antimicrob Agents Chemother 57:2109–2113.

352. Vasseur MV, Laurentie M, Rolland J-G, Perrin-Guyomard A, Henri J, Ferran AA, Toutain P-L, Bousquet-Mélou A. 2014. Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure Klebsiella pneumoniae lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. Antimicrob Agents Chemother 58:1744–1748.

353. Moore RA, Bates NC, Hancock RE. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. Antimicrob Agents Chemother 29:496–500.

354. 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.

355. 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.

356. Mouton JW, Vinks AA. 2005. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling of Antibacterials In Vitro and In Vivo Using Bacterial Growth and Kill Kinetics. Clin Pharmacokinet 44:201–210.

357. Huang JX, Blaskovich MAT, Pelingon R, Ramu S, Kavanagh A, Elliott AG, Butler MS, Montgomery AB, Cooper MA. 2015. Mucin Binding Reduces Colistin Antimicrobial Activity. Antimicrob Agents Chemother 59:5925–5931.

358. Sandri AM, Landersdorfer CB, Jacob J, Boniatti MM, Dalarosa MG, Falci DR, Behle TF, Bordinhão RC, Wang J, Forrest A, Nation RL, Li J, Zavascki AP. 2013. Population pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients: implications for selection of dosage regimens. Clin Infect Dis 57:524–531.

359. Nguyen THT, Mouksassi M-S, Holford N, Al-Huniti N, Freedman I, Hooker AC, John J, Karlsson MO, Mould DR, Pérez Ruixo JJ, Plan EL, Savic R, van Hasselt JGC, Weber B, Zhou C, Comets E, Mentré F, Model Evaluation Group of the International Society of Pharmacometrics (ISoP) Best Practice Committee. 2017. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 6:87–109.

360. Jacobs M, Grégoire N, Couet W, Bulitta JB. 2016. Distinguishing Antimicrobial Models with Different Resistance Mechanisms via Population Pharmacodynamic Modeling. PLOS Computational Biology 12:e1004782.

361. Chauzy A, Ih H, Jacobs M, Marchand S, Grégoire N, Couet W, Buyck JM. 2020. Sequential Time-Kill, a Simple Experimental Trick To Discriminate between Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Models with Distinct Heterogeneous Subpopulations versus Homogenous Population with Adaptive Resistance. Antimicrob Agents Chemother 64:e00788-20.

362. Ly NS, Bulitta JB, Rao GG, Landersdorfer CB, Holden PN, Forrest A, Bergen PJ, Nation RL, Li J, Tsuji BT. 2015. Colistin and doripenem combinations against Pseudomonas aeruginosa: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance. J Antimicrob Chemother 70:1434–1442.

363. Rao GG, Ly NS, Bulitta JB, Soon RL, San Roman MD, Holden PN, Landersdorfer CB, Nation RL, Li J, Forrest A, Tsuji BT. 2016. Polymyxin B in combination with doripenem against heteroresistant Acinetobacter baumannii: pharmacodynamics of new dosing strategies. J Antimicrob Chemother 71:3148–3156.

364. 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.

365. Deroche L, Aranzana-Climent V, Rozenholc A, Prouvensier L, Darnaud L, Grégoire N, Marchand S, Ploy M-C, François B, Couet W, Barraud O, Buyck JM. 2023. Characterization of Pseudomonas aeruginosa resistance to ceftolozane-tazobactam due to ampC and/or ampD mutations observed during treatment using semi-mechanistic PKPD modeling. Antimicrob Agents Chemother 67:e0048023.

366. Harris KA, Breaker RR. 2018. Large noncoding RNAs in bacteria. Microbiol Spectr 6:10.1128/microbiolspec.RWR-0005–2017.

367. Stav S, Atilho RM, Mirihana Arachchilage G, Nguyen G, Higgs G, Breaker RR. 2019. Genome-wide discovery of structured noncoding RNAs in bacteria. BMC Microbiology 19:66.

368. Li Y. 2021. Modern Epigenetics Methods in Biological Research. Methods 187:104–113.

369. Ledford H. 2023. Dogma-defying bacteria package DNA in unusual ways. Nature 614:401–401.

370. Brunner M, Derendorf H, Müller M. 2005. Microdialysis for in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic characterization of anti-infective drugs. Curr Opin Pharmacol 5:495–499.

371. Marchand S, Chauzy A, Dahyot-Fizelier C, Couet W. 2016. Microdialysis as a way to measure antibiotics concentration in tissues. Pharmacol Res 111:201–207.

372. Jager NGL, van Hest RM, Lipman J, Roberts JA, Cotta MO. 2019. Antibiotic exposure at the site of infection: principles and assessment of tissue penetration. Expert Rev Clin Pharmacol 12:623–634.

373. Dahyot C, Marchand S, Pessini GL, Pariat C, Debaene B, Couet W, Mimoz O. 2006. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of Acinetobacter baumannii-infected rats. Antimicrob Agents Chemother 50:2265–2267.

374. Deepika D, Kumar V. 2023. The Role of "Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK)" New Approach Methodology (NAM) in Pharmaceuticals and Environmental Chemical Risk Assessment. Int J Environ Res Public Health 20:3473.

375. Bäckman P, Arora S, Couet W, Forbes B, de Kruijf W, Paudel A. 2018. Advances in experimental and mechanistic computational models to understand pulmonary exposure to inhaled drugs. Eur J Pharm Sci 113:41–52.

376. Dahyot C, Marchand S, Bodin M, Debeane B, Mimoz O, Couet W. 2008. Application of basic pharmacokinetic concepts to analysis of microdialysis data: illustration with imipenem muscle distribution. Clin Pharmacokinet 47:181–189.

377. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications - NLM Catalog - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101510735. Retrieved 5 November 2023.

378. Boisson M, Torres BGS, Yani S, Couet W, Mimoz O, Dahyot-Fizelier C, Marchand S, Grégoire N. 2019. Reassessing the dosing of cefoxitin prophylaxis during major abdominal surgery: insights from microdialysis and population pharmacokinetic modelling. J Antimicrob Chemother 74:1975–1983.

379. Fuseau E, Sheiner LB. 1984. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with a nonparametric pharmacodynamic model. Clin Pharmacol Ther 35:733–741.

380. EUCAST_SOP_10.2_MIC_distributions_and_epidemiological_cut-off_value__ECOFF__setting_20211202.pdf.

381. 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.

RÉSUMÉ

PK/PD modelling contribution of in vitro and in vivo data to fight against antibioresistance

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, polymyxin B, semi-mechanistic PK/PD modelling, inoculum effect, CAMHB dilution effect, transcriptomics, mucin, *in vitro / in vivo* correlation.

Abstract

In the current context of emerging resistance to antibiotics, the use of them must be improved by optimising their dosing regimens to increase their efficacy while limiting their toxicity and reducing the development of resistance. This optimisation relies on better characterisation of the pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) relationships of antibiotics in order to better understand the effects of these molecules on bacteria. However, PK/PD studies are based on *in vitro* tests that are often standardised and carried out under experimental conditions that are difficult to transpose to the *in vivo* environment, leading to a lack of correlation between predictions made from PK/PD studies and results obtained *in vivo*.

The first part of this thesis aimed to use semi-mechanistic modelling approaches to assess the effect of *in vitro* experimental conditions on the PK/PD of polymyxin B (PMB), used as last-resort treatment for multidrug-resistant infections, during 'time-kill' experiments with *Acinetobacter baumannii*, which has been cited as a priority pathogen by WHO. Firstly, the impact of the bacterial inoculum on the efficacy of PMB was assessed. A 17-fold increase in EC_{50} (concentration needed to reach 50% of the maximum effect) was observed between inocula of 10^5 and 10^8 CFU/mL. A second study assessed the impact of nutrient-rich *in vitro* culture media. The results showed that the dilution of the medium up to 10-fold did not affect the growth of the strains in the absence of antibiotics, but resulted in an increase in the bactericidal rate due to PMB, and a reduction in the apparent bacterial regrowth usually observed during *in vitro* experiments. Finally, the impact of the bacterial environment at the infection site was characterised by the addition of mucin (main component of mucus, found in the lungs for example) to the *in vitro* culture medium. The data suggested that, in clinical practice, more than 90% of PMB would be bound to mucin.

In order to enrich the PK/PD models, this thesis also consisted of characterizing the resistance mechanisms responsible for the bacterial regrowth observed during *in vitro* tests. The sequencing results showed that the regrowth observed was not systematically due to the appearance of mutations in resistance genes, suggesting the presence of alternative mechanisms. The transcriptomics study associated with confocal microscopy revealed potential strain adaptation mechanisms.

Finally, the PD models developed from *in vitro* "time-kill" data were connected to a PK model of PMB obtained in mice in order to simulate the evolution of the number of bacteria over time. These predictions were then compared to data observed in lung and thigh mouse infection models. The ability of PK/PD models to predict *in vivo* data was improved when the impact of experimental conditions was taken into account, although further researches are still required.

This research work is part of ongoing efforts to improve PK/PD modelling, by moving towards more mechanistic models in order to better characterise biological phenomena and to be able to extrapolate *in vitro* or *in vivo* observations to broader situations. It has shown that variations in *in vitro* experimental conditions have a significant impact on PK/PD, and that in order to improve correlation with *in vivo*, it is necessary to bring *in vitro* experimental conditions closer to the pathophysiological *in vivo* environment. Mechanistic data provides relevant information on resistance phenomena, but it still remains difficult to incorporate into models today.

Apport de la modélisation PK/PD de données *in vitro* et *in vivo* pour lutter contre la résistance bactérienne

Mots-clés: *Acinetobacter baumannii*, polymyxine B, modélisation PK/PD semi-mécanistique, effet inoculum, effet dilution du CAMHB, transcriptomique, mucine, corrélation *in vitro / in vivo*.

Résumé de la thèse

Dans le contexte actuel d'émergence de résistance aux antibiotiques, l'utilisation de ces derniers doit être améliorée avec une optimisation de leurs schémas posologiques pour augmenter leur efficacité tout en limitant leur toxicité et en réduisant le développement de résistances. Cette optimisation repose sur une meilleure caractérisation de la relation pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) des antibiotiques afin de mieux comprendre leurs effets sur les bactéries. Cependant, les études PK/PD reposent sur des tests *in vitro* standardisés et réalisés dans des conditions expérimentales peu ou pas transposables à l'environnement *in vivo* ; entrainant un manque de corrélation entre les prédictions faites à partir des études PK/PD et les résultats obtenus *in vivo*.

La première partie de cette thèse a visé à évaluer par des approches de modélisation semi-mécanistique, l'effet des conditions expérimentales *in vitro* sur la PK/PD de la polymyxine B (PMB), traitement de dernier recours pour traiter les infections multi-résistantes, lors d'expériences de « time-kill » avec *Acinetobacter baumannii* cité comme pathogène prioritaire par l'OMS. Dans un premier temps, l'impact de l'inoculum bactérien sur l'efficacité de la PMB a été évalué. Une augmentation de l'EC_{50} (concentration permettant l'obtention de 50% de l'effet maximal) par un facteur 17 a été observée entre les inocula à 10^5 et 10^8 UFC/mL. Une seconde étude a évalué l'impact des milieux de culture *in vitro* riches en nutriment. Les résultats ont montré que la dilution du milieu jusqu'à 10 fois n'affectait pas la croissance des souches sans antibiotique, mais qu'elle entrainait une augmentation de la vitesse de bactéricide due à la PMB, et une réduction de la repousse bactérienne apparente observée habituellement lors des expériences *in vitro*. Enfin l'impact de l'environnement bactérien au niveau du site d'infection a été caractérisé par l'ajout de mucine (principal composant du mucus retrouvé notamment dans les poumons) dans le milieu de culture *in vitro*. Les données suggèrent qu'en clinique plus de 90% de la PMB serait liée à la mucine.

Afin d'enrichir les modèles PK/PD, le travail de cette thèse a également consisté à caractériser les mécanismes de résistance responsables des repousses bactériennes observées lors des tests *in vitro*. Les résultats de séquençage ont démontré que les repousses observées n'étaient pas systématiquement dues à l'apparition de mutations dans les gènes de résistance, suggérant la présence de mécanismes alternatifs. L'étude de transcriptomique associée à de la microscopie confocale a permis de mettre en évidence de potentiels mécanismes d'adaptation des souches.

Enfin, les modèles PD développés à partir des données de time-kill *in vitro* ont été connectés à un modèle PK de la PMB obtenu chez la souris afin de simuler l'évolution du nombre de bactéries au cours du temps. Ces prédictions ont ensuite été comparées aux données observées dans des modèles murins d'infection du poumon et de la cuisse. La capacité des modèles PK/PD à prédire les données *in vivo* était améliorée lorsque l'impact des conditions expérimentales était pris en compte, bien que des recherches complémentaires soient encore nécessaires.

Ce travail de recherche s'inscrit dans les efforts d'amélioration continue de la modélisation PK/PD vers des modèles plus mécanistiques afin de mieux caractériser les phénomènes biologiques et de pouvoir extrapoler les observations *in vitro* ou *in vivo* à des situations plus larges. Il a ainsi permis de montrer que les variations des conditions expérimentales *in vitro* avaient un impact conséquent sur la PK/PD, et que pour améliorer la corrélation avec l'*in vivo*, il était nécessaire de rapprocher les conditions expérimentales *in vitro* de l'environnement physiopathologique *in vivo*. Les données mécanistiques apportent des informations pertinentes sur les phénomènes de résistance mais restent encore difficilement intégrables dans les modèles aujourd'hui.