Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 18 décembre 2024 par

Margot DRAVENY

Accumulation d'antibiotiques et mode d'action de molécules adjuvantes chez les bactéries à Gram-négatif

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Microbiologie

École doctorale
ED 62 – Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Aix-Marseille Univ. INSERM, SSA, MCT
Synchrotron SOLEIL

Composition du jury

Nienke BUDDELMEIJER — Rapporteuse
Institut Pasteur, Paris

Matthieu REFREGIERS — Rapporteur
Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans

Marianne ILBERT — Examinatrice
Bioénergétique et Ingénierie des protéines, Marseille

Mathias WINTERHALTER — Examinateur
Université de Hambourg, Allemagne

Martin PICARD — Examinateur et Président du jury
Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris

Muriel MASI — Directrice de thèse
Aix-Marseille Université, Marseille

Frédéric JAMME — Invité
Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin

MCT Membranes et cibles thérapeutiques

SOLEIL SYNCHROTRON

Affidavit

Je soussignée, Margot Draveny, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Muriel Masi et Frédéric Jamme, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Saint-Aubin, le 16 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Résumé

La multirésistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. L'émergence de résistances et l'absence de nouvelles molécules antibactériennes créent un besoin urgent de développer de nouvelles stratégies innovantes. Les bactéries à Gram-négatif sont particulièrement problématiques en raison de leur imperméabilité membranaire élevée qui représente une barrière efficace à l'accumulation des antibiotiques. Une alternative au développement de molécules antibiotiques est l'utilisation de molécules adjuvantes capables de perméabiliser la membrane externe et de restaurer l'accumulation d'antibiotiques dans les bactéries. Dans ce cadre, des approches permettant de quantifier cette accumulation sont indispensables afin de caractériser l'activité de molécules adjuvantes. La molécule NV716 permet de sensibiliser *P. aeruginosa* à la doxycycline, un antibiotique vis-à-vis duquel cette espèce est naturellement résistante. L'impact de la molécule NV716 sur l'accumulation intracellulaire d'antibiotiques a été observé par des approches de spectrofluorimétrie et de microscopie à fluorescence UV basée sur le rayonnement synchrotron. L'étude de son mode d'action a révélé que NV716 augmentait la perméabilité membranaire en interagissant avec les molécules de LPS présents à la surface bactérienne. Plusieurs approches de microscopie ont ensuite été mises en œuvre afin de caractériser son effet sur l'ultrastructure bactérienne. L'activité synergique de NV716 avec la doxycycline a finalement été étudié dans un modèle d'infection à *P. aeruginosa* de *G. mellonella*. Un projet annexe a été de démontrer la faisabilité d'une approche de microscopie à fluorescence aux rayons X pour quantifier et localiser l'accumulation intracellulaire d'antibiotiques dans des bactéries isolées.

Mots clés : Résistance aux antibiotiques, Bactéries à Gram-négatif, Perméabilité membranaire, Accumulation d'antibiotiques, Adjuvants, Imagerie Synchrotron.

Abstract

Antibiotic resistance is a major threat to public health. The emergence of resistance and the lack of new antibacterial molecules create an urgent need to develop innovative new strategies. Gram-negative bacteria are particularly problematic due to their high membrane impermeability, which represents an effective barrier to antibiotic accumulation. An alternative to the development of antibiotic molecules is the use of adjuvant molecules capable of permeabilizing the outer membrane of Gram-negative bacteria and restoring antibiotic accumulation in bacteria. In this context, approaches that quantify this accumulation are essential to characterize the activity of adjuvant molecules. The polyaminoisoprenic molecule NV716 sensitizes *P. aeruginosa* to doxycycline, an antibiotic to which this bacterial species is naturally resistant. The impact of the NV716 molecule on the intracellular accumulation of antibiotics was observed using spectrofluorimetry and synchrotron-based UV fluorescence microscopy. A study of its mode of action revealed that NV716 increased membrane permeability by interacting with LPS molecules at the bacterial surface. Several microscopy approaches were then used to characterize its effect on bacterial ultrastructure. The synergistic activity of NV716 with doxycycline was finally studied in a *G. mellonella* model of *P. aeruginosa* infection. A secondary project was to demonstrate the feasibility of an X-ray fluorescence microscopy approach to quantify and localize intracellular antibiotic accumulation in isolated bacteria.

Key words : Antibiotic resistance, Gram-negative bacteria, Membrane permeability, Antibiotic accumulation, Adjuvant, Synchrotron Imaging.

Remerciements

Ces trois années de thèse passées au sein de la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL et de l'unité UMR-MD1 Membranes et Cibles Thérapeutiques ont été extrêmement enrichissantes. Je dois cela aux nombreuses personnes rencontrées auxquelles j'exprime mes sincères remerciements.

J'aimerais commencer par remercier chaleureusement ma directrice de thèse la Dr. Muriel Masi pour son encadrement sans faille durant ces trois années et pour m'avoir fait confiance malgré les 800 km de distance entre nous ! Merci pour toutes les discussions et pour tous tes enseignements qui m'ont permis d'apprendre énormément.
Je remercie également mon co-directeur de thèse le Dr. Frédéric Jamme pour l'ensemble des connaissances que j'ai acquises sur les synchrotrons (et sur le rugby). Merci d'avoir toujours fait en sorte de maintenir une jovialité et une cohésion au sein de l'équipe DISCO.

Je voudrais tout particulièrement remercier le Dr. Hugo Chauvet pour son aide extrêmement précieuse, ses conseils et son investissement dans mon projet de thèse. Merci également pour toutes les explications de physique et pour m'avoir accompagné durant tous les temps de faisceau.
J'aimerais remercier de tout mon cœur Valérie Rouam pour son immense soutien et pour sa bienveillance pendant ces trois années. Merci pour ta disponibilité et ton accompagnement qui m'ont été d'une grande aide.

Je remercie profondément tous les membres de l'équipe DISCO pour avoir créé un environnement de travail formidable.
Je remercie également Axelle De Pauw pour sa contribution au projet et pour toujours avoir gardé son côté positif malgré les difficultés rencontrées au laboratoire.

Je tiens à remercier le directeur de l'unité MCT le Dr. Jean-Michel Bolla et toutes les personnes du laboratoire pour leur accueil pendant les 6 mois passés sous le soleil marseillais, parce que oui je le reconnais, il fait toujours beau à Marseille !
Un grand merci à Marine, Barbara, Emma, Lynda, Jinane et Aurélie d'avoir contribué à l'atmosphère joyeuse qui régnait dans le bureau, et pour l'instauration du fameux « gâteau time » du mercredi. Je reconnais quand même qu'il m'a fallu un certain temps d'adaptation pour comprendre leurs expressions marseillaises bizarres et m'habituer à leur manie de tout le temps dire « ça va » pour dire d'accord !

J'aimerais remercier la Dr. Fabienne Neulat-Ripoll de m'avoir accordé son temps à plusieurs reprises lors de mes venues à l'IRBA et de m'avoir initiée à l'injection des chenilles ! On finit presque par s'y attacher si on ne les regarde pas de trop près…

Je remercie le Dr. Jonathan Perrin de nous avoir accompagné à l'ESRF et de s'être gentiment porté volontaire pour assurer les shifts de nuit. Merci aussi pour nous avoir fait partagé ta passion pour les motos orange même si je peux l'avouer maintenant, j'écoutais surtout par politesse… disons que ça a permis d'augmenter ma culture générale !

Je termine en adressant mes profonds remerciements à ma famille pour leur soutient et leurs encouragements.

Liste des abréviations

ABC :	*ATP-binding cassette*
ADMET :	Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicologie
AMP :	*Antimicrobial peptide*
BAM :	*β-barrel assembly machinery*
BGC :	*Biosynthetic gene cluster*
CCCP :	*Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*
CIP :	Ciprofloxacine
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
DOX :	Doxycycline
EDX :	*Energy dispersive X-ray spectroscopy*
Lol :	*Localization of lipoprotein*
LPS :	Lipopolysaccharide
Lpt :	*Lipopolysaccharide transport*
MDR :	*Multidrug resistant*
ME :	Membrane externe
MET :	Microscopie électronique à transmission
MI :	Membrane interne
OMP :	*Outer membrane protein*
PHA :	Polyhydroxyalcanoates
PLL :	Poly-L-Lysine
PMB :	Polymyxine B
PolyP :	Polyphosphates
PPK :	Polyphosphate kinase
SICAR :	*Structure Intracellular Concentration Activity Relationship*
STEM :	*Scanning transmission electron microscopy*
SXT :	*Soft X-ray tomography*
UFC :	Unité formant colonie
UFR :	Unité de fluorescence relative
XRF :	*X-ray fluorescence*

Sommaire

Affidavit ***2***

Résumé ***3***

Abstract ***4***

Remerciements ***5***

Liste des abréviations ***6***

Sommaire ***7***

Introduction ***9***

La résistance aux antibiotiques **9**

Les bactéries à Gram-négatif **11**

Cibler la membrane externe **18**

I) Biogénèse de la membrane externe 18

1. Machinerie BAM 18

Description et fonctionnement 18

Inhibiteurs 19

2. Complexe Lpt 24

Description et fonctionnement 24

Inhibiteurs 26

3. Complexe Lol 30

Description et fonctionnement 30

Inhibiteurs 31

II) Structure de la membrane externe 34

1. Peptides antimicrobiens 34

2. Molécules adjuvantes 39

Contexte et description du projet ***47***

Synchrotron SOLEIL **49**

Résultats et discussion ***51***

Partie 1 : Étude du mode d'action du dérivé polyamino-isoprénique NV716 ..... **51**

I) Effet de NV716 sur l'activité antibactérienne d'antibiotiques 51

II) Accumulation d'antibiotiques par spectrofluorimétrie sur population totale 52

1. Mesure de l'accumulation de la ciprofloxacine 52

2. Mesure de l'accumulation de la doxycycline 53

a. Quantification dans des lysats bactériens 53

b. Suivi au cours du temps dans des bactéries intactes 55

III) Accumulation d'antibiotiques par microscopie à fluorescence UV sur bactéries uniques 58

1. Méthode classique 58

a. Accumulation de la ciprofloxacine 58

2. Mise au point d'un dispositif de microfluidique 60

IV) Interaction de NV716 avec le LPS 63

1. Tests de déplacement de la BODIPY-cadavérine 63

2. Tests de sensibilité 64

V) Étude de l'activité de NV716 par différentes techniques de microscopie 66

1. Microscopie à fluorescence 66

2. Microscopie électronique à transmission et EDX 67

3. Cryo-tomographie aux rayons X 71

4. Microscopie à fluorescence aux rayons X 76

VI) Test de survie chez le modèle d'infection *Galleria mellonella* 78

Partie 2 : Quantification et localisation d'un dérivé métallique de la ciprofloxacine chez *Escherichia coli* 79
I. Comparaison de l'accumulation de la ciprofloxacine et de son dérivé métallique 79
1. Mesure par spectrofluorimétrie sur les populations bactériennes 80
2. Mesure par microscopie à fluorescence UV sur bactéries uniques 80
II. Quantification et localisation du dérivé antibiotique par fluorescence aux rayons X 81
1. Quantification 82
2. Localisation 83
III. Étude de l'accumulation de la ciprofloxacine et de son dérivé métallique dans des mutants Gyr d'*Escherichia coli* 84

Conclusion 87

Matériels et Méthodes 95
Souches bactériennes et conditions de culture 95
Test de sensibilité aux antibiotiques 95
Accumulation d'antibiotiques pour une mesure dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie 96
Lyse et détermination de la concentration intracellulaire en antibiotique par spectrofluorimétrie ... 96
Test d'interaction de la doxycycline avec des ribosomes purifiés 96
Accumulation de la doxycycline au cours du temps par spectrofluorimétrie 96
Estimation du gain de perméabilité membranaire 97
Accumulation par microscopie à fluorescence UV – Méthode classique 97
Fabrication d'un dispositif de microfluidique 98
Accumulation par microscopie à fluorescence UV – Microfluidique 98
Test de déplacement de la BODIPY-Cadavérine 99
Microscopie à fluorescence 99
Microscopie électronique à transmission 99
Microscopie électronique à transmission en mode balayage et spectroscopie EDX 100
Cryo-tomographie aux rayons X (SXT) 100
Isolement et quantification de vésicules bactériennes 101
Analyse de la présence de LPS par dot-blot 101
Modèle d'infection *Galleria mellonella* 101
Microscopie à fluorescence aux rayons X (XRF) 101
Quantification des éléments par microscopie à fluorescence aux rayons X (XRF) 102
Tomographie de fluorescence aux rayons X 102

Références bibliographiques 103

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences 120

Introduction

La résistance aux antibiotiques

Le début du XXème siècle a été marqué par la découverte et la mise sur le marché des premiers antibiotiques, constituant une avancée majeure en médecine humaine. De nombreuses maladies infectieuses autrefois mortelles ont pu alors être traitées avec succès par les antibiotiques. Toutefois, des décennies plus tard, l'efficacité des antibiotiques est de plus en plus menacée, jusqu'à être considérée comme l'un des problèmes majeurs du XXIème siècle en termes de santé publique mondiale. L'engouement vis-à-vis de ces « remèdes miracles » a conduit à une utilisation excessive et souvent inadéquate des antibiotiques, favorisant la sélection de mutants résistants. Ce phénomène, qui survient de façon naturelle au sein des populations bactériennes, a été accéléré par l'utilisation d'antibiotiques chez l'Homme et les animaux d'élevage dans la seconde moitié du XXème siècle (Fig. 1).

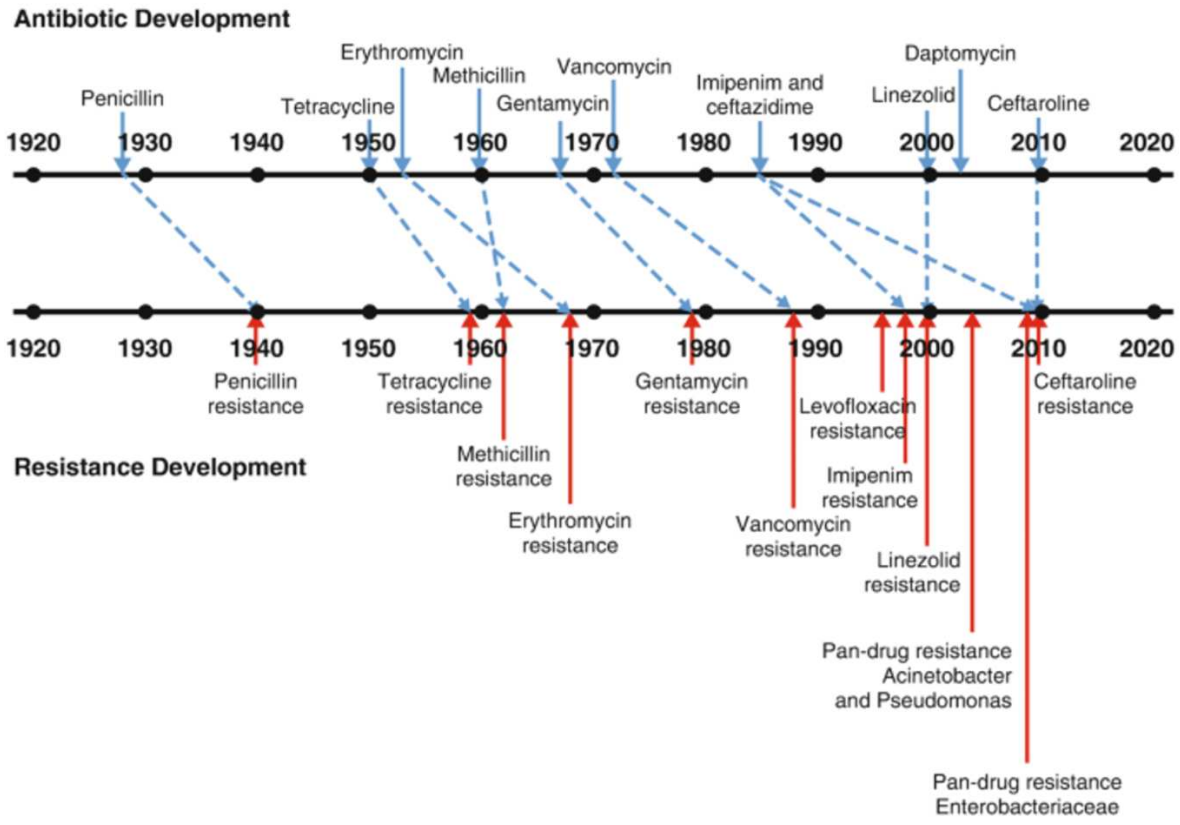


Figure 1 : Chronologie de l'introduction des antibiotiques (en bleu) et exemples d'identification de la résistance (en rouge). *Figure extraite de Milgroom, M.G. (2023). Antimicrobial Resistance. In: Biology of Infectious Disease. Springer, Cham.*

Les 22 classes d'antibiotiques actuellement approuvées pour le traitement systémique des infections bactériennes, à l'exclusion du traitement de la tuberculose, ont cinq mécanismes généraux pour tuer les bactéries ou arrêter leur croissance : interférer avec (i) la synthèse de la paroi cellulaire, (ii) la biosynthèse des protéines, (iii) la synthèse de l'ADN, (iv) le métabolisme de l'acide folique ou (v) l'intégrité des membranes bactériennes.

Les mutations dans les gènes codant pour les protéines cibles des antibiotiques sont à l'origine de phénotypes de résistance qui ne concernent en général qu'une seule famille d'antibiotiques. À l'inverse, l'acquisition de matériel génétique mobile (sous la forme d'un plasmide ou d'un transposon), généralement porteur de plusieurs gènes de résistance, entraine des phénotypes de multirésistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques ou familles d'antibiotiques. Ce transfert génétique horizontal pouvant se faire entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes, il s'agit du moyen de dissémination de la résistance aux antibiotiques le plus rapide et le plus problématique en clinique.

En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publiait une liste d'agents pathogènes prioritaires contre lesquels il était urgent de trouver de nouvelles molécules antibiotiques.[1] Une mise à jour de cette liste a été publiée en 2024, comportant toujours 3 catégories d'urgence : critique, élevée, et moyenne. Parmi les pathogènes classés en priorité critique, *Mycobacterium tuberculosis* résistant à la rifampicine a été ajouté aux bactéries à Gram-négatif *Acinetobacter baumannii* résistant aux carbapénèmes et aux Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ou aux céphalosporines de 3ème génération déjà catégorisées critiques en 2017, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux carbapénèmes est passée de priorité critique à élevée.[2]

Face à l'absence de nouvelles molécules antibiotiques, couplée à l'augmentation et à la propagation rapides des mécanismes de résistance, les options thérapeutiques s'amoindrissent, ne laissant parfois aucune solution face aux infections graves. En 2019, une estimation rapportait près de 5 millions de morts associées aux résistances antimicrobiennes dont plus d'1 million sont directement attribuables à ces résistances.[3] Il existe un besoin urgent d'innover et de développer de nouvelles molécules antibiotiques, notamment contre les bactéries à Gram-négatif qui représentent la majorité des bactéries dans la liste des pathogènes prioritaires de l'OMS.

Les bactéries à Gram-négatif

Les bactéries à Gram-négatif résistent à l'activité des antibiotiques selon quatre modalités principales : l'inactivation enzymatique, la modification de cible, l'imperméabilité membranaire, et l'efflux.[4]
L'inactivation enzymatique consiste soit en la dégradation de l'antibiotique, comme c'est le cas des β-lactamines hydrolysées par des β-lactamases ; soit en la modification de l'antibiotique par l'ajout de groupements chimiques, l'empêchant de se fixer à sa cible.[5]
Concernant la modification de cible, il s'agit de modifications affectant la cible de l'antibiotique et non l'antibiotique lui-même, mais le résultat est le même, l'antibiotique ne reconnaît plus sa cible, sans toutefois que l'activité de la protéine cible ne soit affectée.[6] Contrairement à ces deux types de mécanisme de résistance qui sont spécifiques d'une famille d'antibiotique donnée, l'imperméabilité membranaire et l'efflux affectent plusieurs familles d'antibiotiques, conduisant à l'émergence de multi-résistances (Fig. 2).

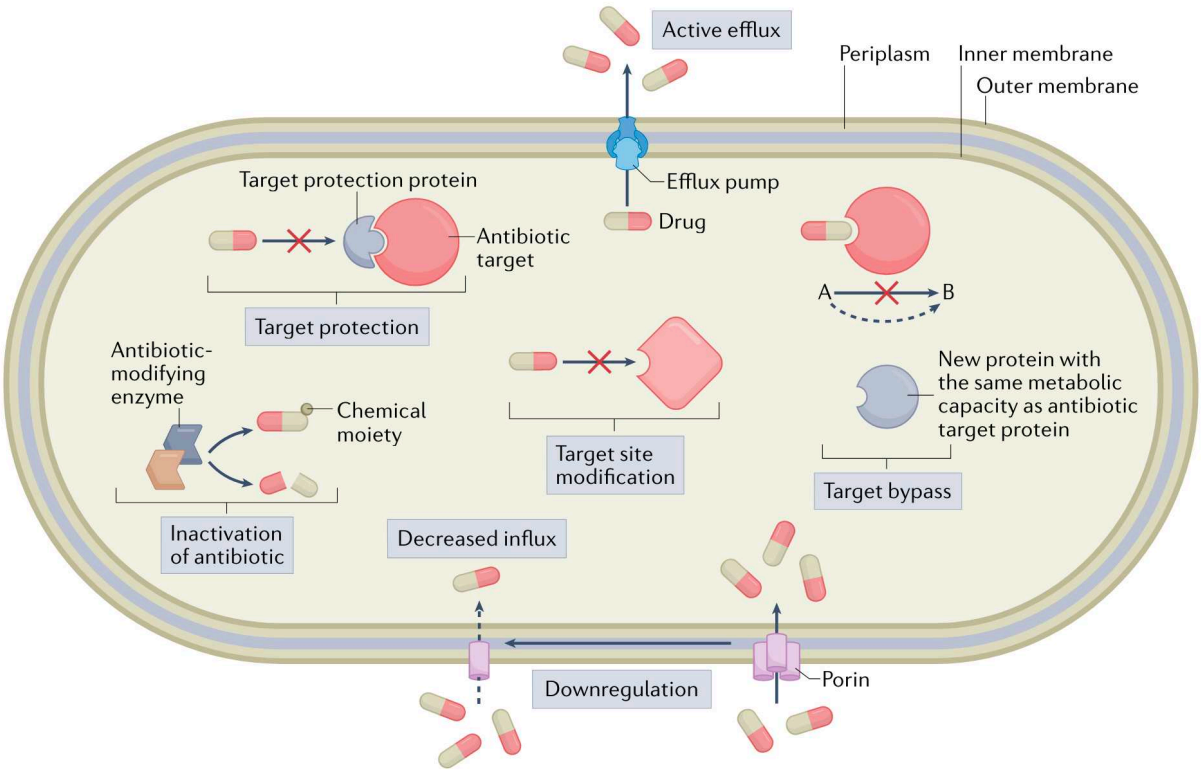


Figure 2 : Vue d'ensemble des mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques. L'inactivation des antibiotiques est assurée par des enzymes qui dégradent ou modifient la molécule d'antibiotique. La dégradation enzymatique implique l'hydrolyse du groupe fonctionnel de l'antibiotique, ce qui le rend inefficace. Les enzymes qui modifient les antibiotiques transfèrent divers groupes chimiques à l'antibiotique, ce qui empêche la liaison de l'antibiotique à sa cible. La modification du site cible implique une modification de la cible de l'antibiotique afin de réduire la liaison de l'antibiotique. Il peut s'agir de mutations dans le gène codant pour la protéine cible de la molécule antibiotique ou d'une modification enzymatique du site de liaison. Lors du contournement de la cible, la fonction de la cible de l'antibiotique est accomplie par une nouvelle protéine qui n'est pas inhibée par l'antibiotique, ce qui rend la cible originale redondante et l'antibiotique inefficace. La protection de la cible implique généralement l'association physique d'une protéine de protection de la cible avec la cible de l'antibiotique, la libérant ainsi de l'inhibition médiée par l'antibiotique. La diminution de l'accumulation intracellulaire d'antibiotiques est médiée par des modifications de la structure de la membrane, par exemple la régulation à la baisse des porines, qui sont des protéines transmembranaires permettant le transport passif de divers composés, tels que les antibiotiques, dans la cellule bactérienne. L'efflux actif est facilité par les pompes d'efflux transmembranaires, qui exportent les antibiotiques hors des cellules bactériennes afin de réduire leur concentration intracellulaire. *Figure extraite de Darby E.M. et al. Nat Rev Microbiol. 2023.*

L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif est composée d'une membrane interne (MI), d'un espace périplasmique dans lequel se trouve le peptidoglycane et d'une membrane externe (ME). À la différence de la MI qui se définie par une bicouche phospholipidique, la ME possède une structure asymétrique avec un feuillet interne composé de phospholipides et un feuillet externe constitué exclusivement de lipopolysaccharides (LPS)[7].

La majorité des antibiotiques présente un certain degré d'hydrophobicité, ce qui leur permet de diffuser librement à travers la bicouche lipidique de la MI. A l'inverse, la présence de LPS dans la ME constitue une barrière efficace contre la pénétration rapide de ces antibiotiques lipophiles. Pour autant, l'import de nutriments à partir du milieu extérieur est essentiel et est assuré par des protéines d'une classe particulière, les porines, qui produisent des canaux de diffusion non-spécifique à travers la ME. Cependant, les propriétés des canaux formés par les porines contribuent à l'exclusion des antibiotiques de plusieurs manières. Chez *Escherichia coli*, les porines majoritaires OmpF et OmpC sont organisées sous forme de trimères dont chaque monomère forme un canal composé de 16 feuillets β (Fig. 3). Les canaux se présentent sous une forme de sablier dont la partie la plus étroite est appelée « région de constriction » (RC). Celle-ci résulte du repliement de la boucle extracellulaire L3 qui réduit le diamètre des canaux (7 × 10 Å) et rend la perméation de nombreux antibiotiques extrêmement lente voire impossible. En outre, la RC est bordée d'acides aminés chargés qui orientent les molécules d'eau et qui limite la perméation de molécules lipophiles dans la RC. Malgré cet arrangement, des petites molécules relativement hydrophiles peuvent pénétrer à travers les canaux des porines d'*E. coli* et d'autres entérobactéries (voir ci-dessous)[8].

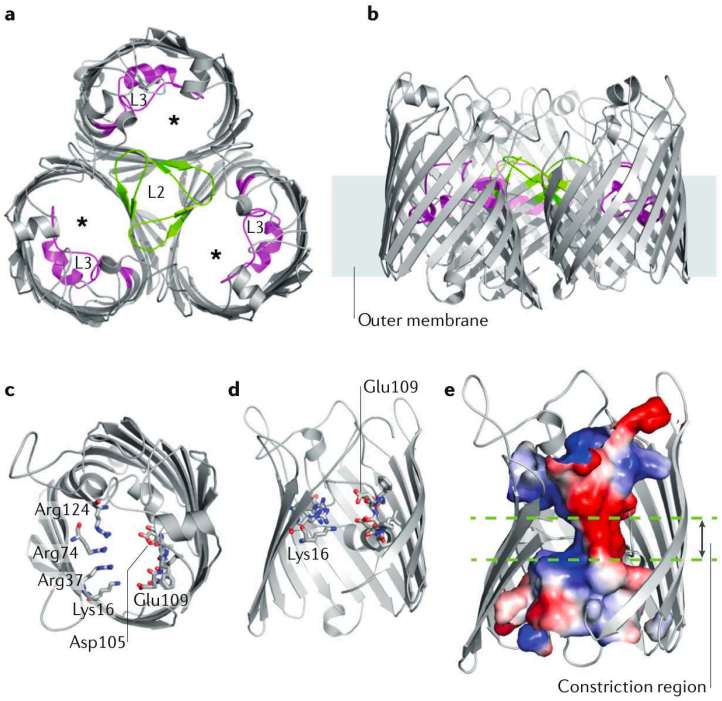


Figure 3 : Aspects structuraux des porines des entérobactéries. (a,b) Vues extracellulaire (a) et latérale (b) du trimère OmpC d'*E. coli* (Protein Data Bank ID 2J1N). Le canal délimité par chaque monomère est indiqué par un astérisque. Les porines sont composées de brins β arrangés en tonneaux β intégrés dans la ME. La boucle extracellulaire L2 est colorée en vert et la boucle L3 à l'origine du rétrécissement des canaux est colorée en magenta. (c,d) Vues du côté extracellulaire (c) et du côté périplasmique (d). (d) Dans un monomère de OmpC, les résidus chargés positivement (Lys16, Arg37, Arg74 et Arg124) du tonneau β font face aux résidus chargés négativement (Asp105 et Glu109) de la boucle L3. Ces résidus génèrent un champ électrique transversal dans la RC. (e) Coupe transversale de OmpC montrant l'intérieur du canal en forme de sablier et coloré par le potentiel électrostatique. *Figure extraite de Vergalli J. et al. Nat Rev Microbiol, 2020.*

Les bactéries à Gram-négatif sont naturellement résistantes à de nombreux antibiotiques en raison de l'imperméabilité de leur ME.[9] Les molécules de LPS qui recouvrent la surface bactérienne constituent une barrière à la diffusion de larges molécules, aussi bien hydrophiles que lipophiles, tandis que les porines ne laissent passer que de petites molécules hydrophiles. De plus, les antibiotiques qui parviennent à traverser la ME sont susceptibles d'être expulsés hors de la cellule par des pompes d'efflux dont l'organisation tripartite traverse toute l'enveloppe bactérienne.

Le LPS est une molécule amphipathique poly-anionique, dont la structure peut être divisée en trois parties : le lipide A, le noyau oligosaccharidique, et l'antigène O (Fig. 4A).[10]

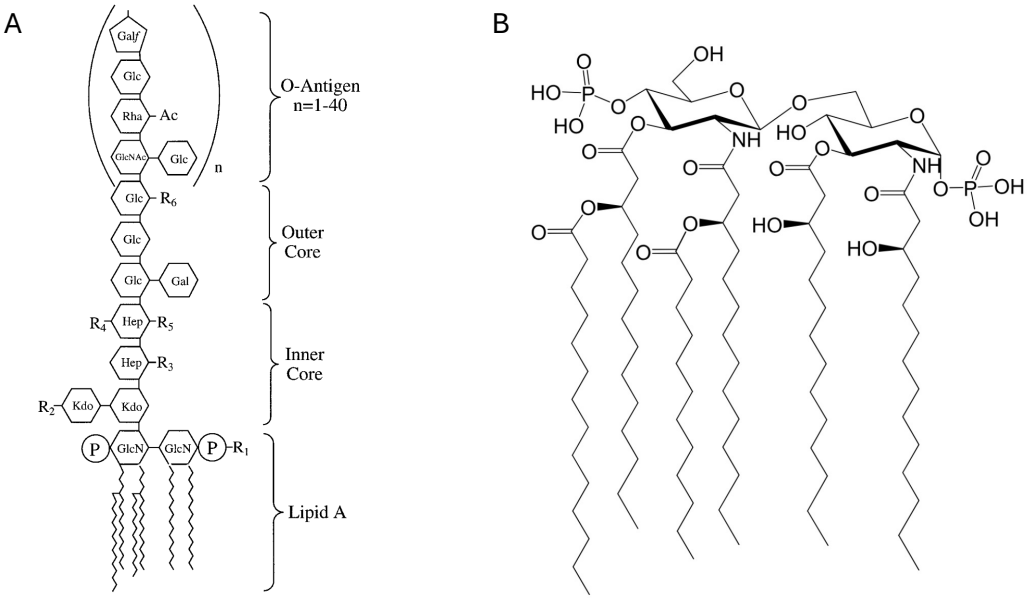


Figure 4 : Structures du lipopolysaccharide (A) et du lipide A (B) *d'E coli. Figure extraite de Kadrmas et Raetz, J Biol Chem, 1998*.

À la différence des phospholipides qui ne possèdent que 2 chaînes d'acides gras, le lipide A en compte entre 4 et 8 qui sont liées de façon covalente à un disaccharide de glucosamine phosphorylé positions 1 et 4' (Fig. 4B). De plus, comparé aux acides gras insaturés des phopholipides, les acides gras saturés du lipide A réduisent la fluidité et donc la perméabilité de la membrane.[11] La longueur des chaînes carbonées, leur nombre et leur position au niveau des glucosamines varient selon les espèces bactériennes et influencent les propriétés de perméabilité de la membrane externe.[12]

Le noyau oligosaccharidique se divise en deux régions distinctes, une région interne hydrophobe liée au lipide A et une région externe hydrophile. La partie interne, assez bien conservée au sein des espèces bactériennes, est constituée de domaines Kdo (acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique) et de résidus heptose (L ou D-glycéro-D-manno-heptose), qui peuvent être phosphorylés ou contenir des substituts de phosphoéthanolamine. La partie externe est en revanche beaucoup plus variable et se compose majoritairement d'hexoses, en général de glucose et de galactose. Les groupements phosphate chargés négativement au niveau du lipide A et de la partie interne du noyau oligosaccharidique sont neutralisés par des cations divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}) qui d'une part empêchent la répulsion des molécules de LPS adjacentes et d'autre part les relient entre elles latéralement, participant à la rigidité de la membrane externe.

L'antigène O est un polysaccharide qui consiste en plusieurs répétitions d'une unité oligosaccharidique O. Situé à l'extrémité du LPS, il s'agit de la partie la plus variable, dont la longueur et la composition varient selon les espèces, et selon les bactéries au sein d'une même espèce.[13] Certaines souches bactériennes ne possèdent pas d'antigène O. Les molécules de LPS sont alors appelées lipooligosaccharides (LOS) et référées comme « *rough* » LPS par comparaison au « *smooth* » LPS contenant l'antigène O.[10]

Les variations de structure et de composition du LPS sont à l'origine des différences de sensibilité des espèces vis-à-vis des antibiotiques.[14] Certaines souches bactériennes présentent des résistances naturelles, auxquelles peuvent s'ajouter des résistances obtenues suite à des mutations dans l'ADN chromosomique, ou à l'acquisition de gènes de résistance affectant le LPS.[15]

La présence de porines dans la ME des bactéries à Gram-négatif explique également les différences de perméabilité membranaire entre les espèces. Comme évoqué précédemment, les porines sont des canaux transmembranaires en forme de tonneaux β qui facilitent la diffusion de petites molécules hydrophiles. Leur nombre, leur diamètre et leur spécificité peuvent varier d'une espèce à l'autre.[9]
Chez *Escherichia coli*, les porines OmpF et OmpC permettent la diffusion passive non-spécifique de molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 600 Da. Ces canaux servent de voies d'entrée à plusieurs familles antibiotiques très utilisées en clinique, telles que les β-lactamines, les fluoroquinolones et les tétracyclines.
Des orthologues de OmpF et OmpC sont retrouvés chez d'autres espèces d'entérobactéries[16] : Omp35 et Omp36 chez *Klebsiella aerogenes*, OmpK35 et OmpK36 chez *Klebsiella pneumoniae*, OmpE35 et OmpE36 chez *Enterobacter cloacae*. En clinique, les mutations localisées dans les gènes orthologues *ompF* ou *ompC* peuvent être à l'origine de la perte des porines (e.g., l'insertion ou la délétion d'un nucléotide responsable du décalage du cadre de lecture entraine généralement l'apparition d'un codon stop prématurément dans la séquence) ou d'un changement structural et fonctionnel dans le canal (e.g., les mutations sélectionnées sont généralement responsables de substitutions à proximité de la RC). D'autres mutations localisées dans des gènes de régulation qui peuvent également agir de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle sur le niveau d'expression des porines. De manière surprenante, les mutants avec une expression réduite des porines ne sont pas très résistants aux antibiotiques. Cela s'explique par le fait que même la barrière de perméabilité la plus efficace ne peut pas empêcher complètement l'afflux de petites molécules.[8,9,17]

Chez d'autres bactéries à Gram-négatif comme *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*, de telles porines n'existent pas, expliquant leur imperméabilité naturelle vis-à-vis de nombreux antibiotiques. On retrouve toutefois de nombreux canaux transmembranaires permettant la diffusion spécifique de substrats.[18,19] Ces deux espèces bactériennes possèdent néanmoins des porines non-spécifiques, OprF chez *P. aeruginosa* et $OmpA_{Ab}$ chez *A. baumannii*,[20] qui s'avèrent être des homologues de la porine OmpA chez *E. coli*.
À la différence des porines OmpF et OmpC qui permettent la diffusion rapide de nombreuses molécules, OmpA, OprF, et $OmpA_{Ab}$ permettent une diffusion beaucoup plus lente. Pourtant, OprF et $OmpA_{Ab}$ sont les porines les plus abondantes chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii* respectivement, et la taille de leur pore est aussi large, voire plus, que celle de OmpF et OmpC. La raison de cette faible diffusion s'explique alors par

la structure de ces porines. En effet, OmpA et OprF peuvent se replier en deux conformations distinctes, dites fermée et ouverte.[21] Moins de 5 % de la quantité totale de la protéine se trouve en conformation ouverte, tandis que la conformation fermée est majoritairement représentée. En conformation ouverte, la protéine se replie en un seul domaine, qui consiste en un large tonneau β ayant tendance à former des oligomères. En conformation fermée, la protéine comprend un domaine N-terminal structuré en tonneau β étroit peu perméable, et un domaine C-terminal périplasmique qui se lie de façon non covalente au peptidoglycane.[22] De cette façon, ces porines contribuent à la stabilité membranaire, ce qui leur a valu le nom de porines structurales, puisque présentes majoritairement en conformation fermée.
La diffusion lente d'antibiotiques due à la faible proportion de porines en conformation ouverte favorise leur prise en charge par les pompes d'efflux qui les expulsent hors de la cellule, accentuant le phénomène d'imperméabilité membranaire.

Les pompes d'efflux sont des transporteurs transmembranaires répartis en différentes familles selon leur organisation dans l'enveloppe bactérienne et la source d'énergie utilisée.[23] Les transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*) sont localisés dans la membrane cytoplasmique et utilisent l'hydrolyse de molécules d'ATP comme source d'énergie. Les transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), et MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*) sont également localisés dans la MI mais utilisent comme source d'énergie un antiport de protons ou de cations. Enfin, les transporteurs de type RND (*Resistance Nodulation Division*) traversent l'intégralité de l'enveloppe bactérienne et utilisent un antiport de protons comme source d'énergie. Leur architecture tripartite est composée d'un transporteur actif situé dans la MI, d'une protéine de liaison périplasmique, et d'une protéine canal située dans la ME. Ces pompes d'efflux sont les plus représentées chez les bactéries à Gram-négatif,[24] et peuvent reconnaître et exporter une très grande variété de molécules, incluant de nombreuses familles d'antibiotiques.[25,26]
Chez *P. aeruginosa*, l'efflux joue un rôle particulièrement important dans la résistance intrinsèque de nombreux antibiotiques.[27] En effet, il existe 4 pompes d'efflux majoritaires chez *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, et MexXY-OprM),[28] tandis que chez *E. coli*, et de façon plus générale chez les entérobactéries, AcrAB-TolC est la seule pompe d'efflux majoritaire (Fig. 5).

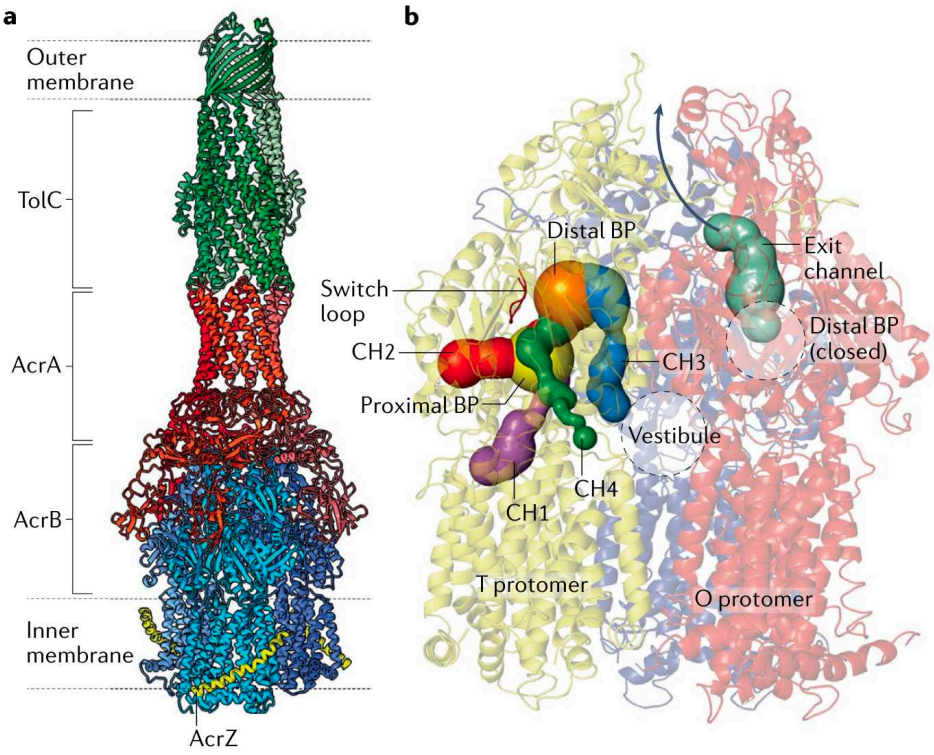


Figure 5 : Structure et canaux d'entrée des systèmes d'efflux RND. (a) Structure cristalline du complexe d'efflux tripartite AcrAB(Z)-TolC (Protein Data Bank (PDB) ID : 5O66). Le transporteur trimérique AcrB dans la MI joue un rôle central dans la reconnaissance des substrats et dans la transduction de l'énergie. Le trimère AcrB interagit avec six copies de la protéine adaptatrice périplasmique AcrA. Le trimère TolC est un canal en forme de canon, dont une extrémité est insérée dans la ME et l'autre extrémité dans l'espace périplasmique interagit avec l'anneau hexamérique d'AcrA de manière « tip-to-tip ». La petite protéine AcrZ interagit avec AcrB et jouerait un rôle dans la modulation allostérique de l'activité d'AcrB. (b) AcrB fonctionne par rotation fonctionnelle selon trois états conformationnels : relâché ou « l*oose* » (L), serré ou « *tight* » (T) et ouvert ou « *open* » (O) non représentés sur ce schéma. Dans le premier état du cycle, un monomère lie un substrat dans son domaine transmembranaire (conformation L), transporte ensuite le substrat du domaine transmembranaire vers la poche de liaison hydrophobe (conversion en conformation T) et libère enfin le substrat vers TolC (conformation O). On suppose que AcrA participe à la transduction des changements de conformation de AcrB vers TolC, ce qui entraîne l'ouverture du canal TolC nécessaire à l'export. Le trimère AcrB est constitué de plusieurs canaux d'entrée pour les substrats reconnus. L'entrée du canal 1 (CH1) est ouverte sur le feuillet externe de la MI. Les substrats entrant dans le CH1 sont guidés vers la poche de liaison proximale (« *binding pocket* » ou BP proximale). L'entrée du canal CH2 est située dans la fente formée par les sous-domaines proximaux C-terminaux PC1 et PC2 et est ouverte sur l'espace périplasmique. Les substrats de masse moléculaire élevée (l'érythromycine ou la rifampicine) pénètrent de préférence par CH2 et se lient à la BP proximale. La boucle de commutation ou « *switch loop* » qui sépare la BP proximale et la poche de liaison distale (BP distale) joue un rôle important dans la translocation des substrats. Les substrats de faible masse moléculaire (le chloramphénicol ou le linézolide) entrent de préférence par CH1 et contournent la BP proximale et la boucle de commutation pour se lier directement à la BP distale. CH3 est ouvert sur la cavité centrale formée par les vestibules entre les interfaces des protomères et est préférentiellement utilisé par les cations aromatiques plans (la berbérine ou le bromure d'éthidium) pour être transportés directement vers la BP distale. L'entrée CH4 est située au niveau du sillon formé par les domaines transmembranaires TM1 et TM2 et mène directement à la BP distale. L'accès à CH4 est privilégié par les substrats carboxylés (certaines β-lactamines ou l'acide fusidique). *Figure extraite de Darby E.M. et al. Nat Rev Microbiol, 2023.*

La multirésistance aux antibiotiques est souvent due à une faible perméabilité membranaire couplée à un efflux actif.[29] Ce phénomène peut être accentué par une diminution, voire une perte de l'expression des porines, associée à une surexpression des pompes d'efflux. Cet effet synergique entre imperméabilité membranaire et efflux entraîne une diminution de la concentration intracellulaire des antibiotiques qui favorise l'apparition de mutations, et donc la survenue de résistances notamment dues à des modifications de cibles.

La ME des bactéries à Gram-négatif constitue une barrière efficace contre l'entrée des antibiotiques. Les cibles cytoplasmiques étant par conséquent difficiles à atteindre, cibler la membrane externe apparaît être une stratégie prometteuse. La section qui suit examine le potentiel de ciblage de la ME des bactéries Gram négatif par diverses approches, notamment l'inhibition des étapes terminales de la biogenèse de ses constituants, y compris celle des protéines de la ME (OMP ; *Outer Membrane Protein*), du LPS et des lipoprotéines, ainsi que la perturbation de son intégrité physique.

D'autres stratégies que j'ai choisi de ne pas détailler dans ce manuscrit incluent la découverte et le développement d'inhibiteurs d'efflux ainsi que la recherche des déterminants moléculaires favorisant l'accumulation des molécules antibactériennes. D'une part, depuis le PAβN (phénylalanine-arginine β-naphthylamide), identifié comme le premier inhibiteur d'efflux chez *P. aeruginosa*,[30] la littérature a rapporté une multitude d'exemples de molécules inhibitrices de l'efflux chez les bactéries à Gram-négatif.[31] Malgré la persévérance des chercheurs impliqués, aucune de ces molécules n'a encore suscité l'intérêt de l'industrie. Un espoir est toutefois possible avec la découverte de dérivés pyridylpipérazine par une équipe de l'Institut Pasteur de Lille.[32,33] D'autre part, plusieurs années de recherche sur les déterminants moléculaires impactant la perméation des antibiotiques à travers la ME et leur reconnaissance par les pompes d'efflux, combinées au développement de l'intelligence artificielle, représentent aujourd'hui une piste très prometteuse pour la découverte de nouveaux espaces chimiques capables d'améliorer l'accumulation (et par extension l'activité) d'antibiotiques déjà disponibles sur le marché comme celle de nouvelles molécules antibactériennes en cours de développement.[34–40] La tâche s'avère d'ores et déjà fastidieuse car les études réalisées jusqu'ici chez *E. coli* et *P. aeruginosa* ont mis en évidence des règles de perméation moléculaire spécifique de chaque espèce (Fig. 6).

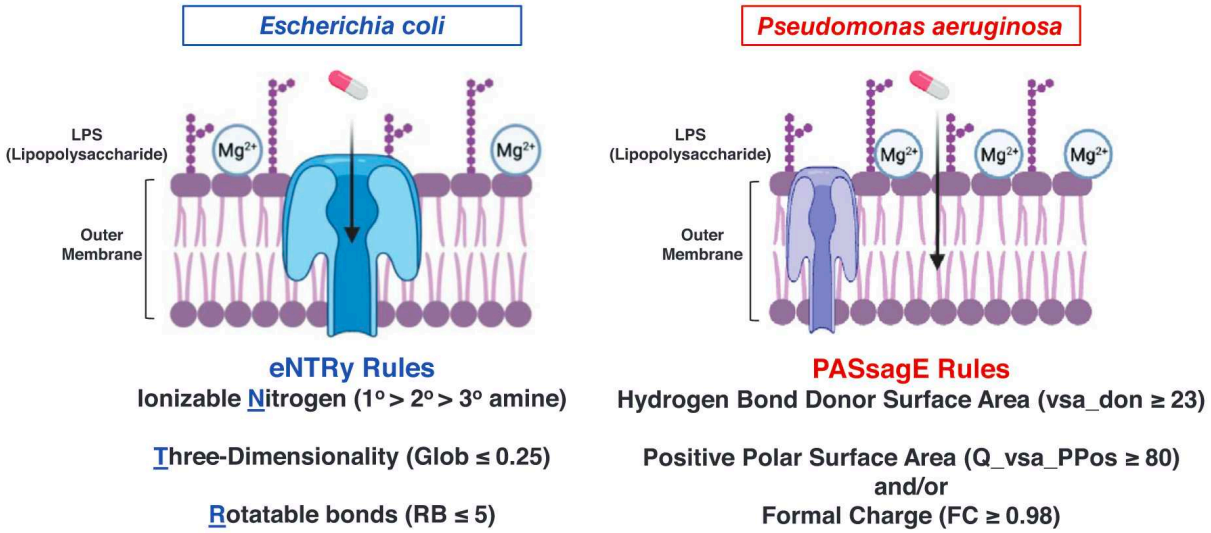


Figure 6 : Différences dans la physiologie de la membrane externe et règles de perméation pour les bactéries à Gram-négatif. Les composés conformes à la règle eNTRy peuvent pénétrer dans *E. coli* par les porines et les composés conformes à la règle PASsagE (*Pseudomonas Aeruginosa Self-promoted Entry*) entrant par la voie de l'absorption autopromue chez *P. aeruginosa*. *Figure extraite de Cain N. et Hergenrother P. J. Clin Trans. Med. 2024.*

Cibler la membrane externe

I) Biogénèse de la membrane externe

1. Machinerie BAM

Description et fonctionnement

Parmi les complexes qui jouent un rôle dans la biogenèse de la ME, la machinerie d'assemblage BAM (*β-barrel Assembly Machinery*) est impliquée dans le repliement et l'insertion des OMPs[41] (Fig. 7). BAM est un complexe hétéropentamérique composé d'une protéine principale BamA, qui est formée en C-terminal d'un tonneau β inséré dans la ME et d'une partie périplasmique N-terminale composée de domaines POTRA (*POlypeptides TRansport-Associated*). Le complexe BAM comprend également quatre lipoprotéines BamB, BamC, BamD, et BamE ancrées dans le feuillet interne de la ME et interagissant directement ou non avec la partie périplasmique de BamA. BamA et BamD sont les deux protéines essentielles du complexe.[41,42] Avant d'être pris en charge par BAM, les polypeptides naissants des OMPs traversent la MI par l'intermédiaire du système de translocation Sec qui reconnaît la séquence signale à l'extrémité N-terminale du polypeptide.[43] Une fois dans le périplasme, des chaperonnes (SurA ou Skp/DegP) se lient aux polypeptides des OMPs et les guident jusqu'au complexe BAM.[44] Les quatre lipoprotéines associées à BamA reçoivent les polypeptides et les transfèrent à BamA.

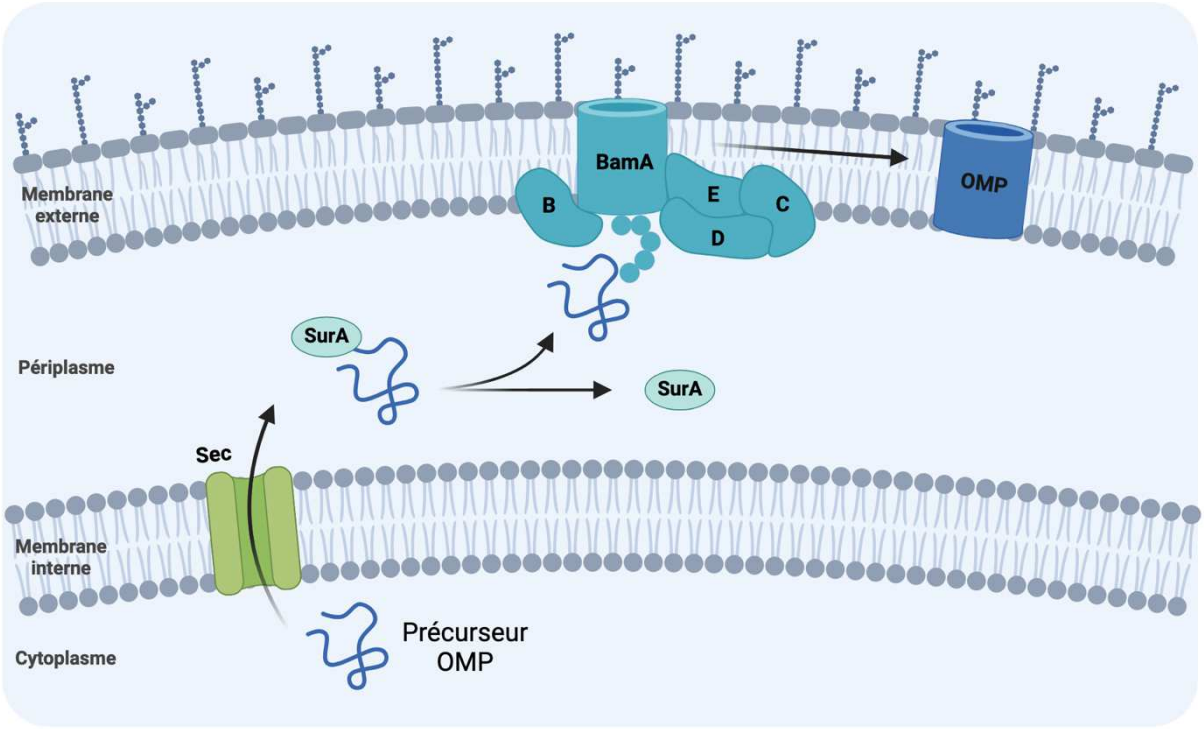


Figure 7 : Mécanisme de transport des porines via le complexe BAM. Sec, translocon ; SurA, protéine chaperonne. *Figure réalisée avec BioRender.*

Le tonneau β de BamA est composé de 16 feuillets β dont les premier et dernier interagissent faiblement par des liaisons hydrogène, permettant ainsi une flexibilité nécessaire à l'ouverture et à la fermeture d'une « porte » latérale. Cette porte latérale est dynamique et l'alternance entre les conformations « ouverte » et « fermée » joue un rôle critique dans le repliement et l'insertion des OMPs dans la ME.[45–47] Dans cette porte latérale, une séquence de quelques résidus située à l'extrémité C-terminale des polypeptides et appelée signal β se lie au premier brin β de BamA.[48,49]
Toutefois, le mécanisme de repliement des nouvelles OMPs lors de leur passage par BamA est encore mal compris. Deux modèles de fonctionnement de BamA ont été proposés : (i) dans le modèle « bourgeonnant » (*budding model*), les feuillets β de l'OMP naissante se replient en interagissant avec le canal BamA, formant un canal hybride transitoire ; (ii) dans le modèle « assisté » (*assisted model*), le tonneau β commence à se replier dans le périplasme en interagissant avec les domaines POTRA de BamA, puis s'insère dans la ME via le canal BamA. Alors que les expériences *in vivo* et *in vitro* soutiennent le modèle « assisté », les observations de BamA dans une conformation latéralement ouverte par des approches structurales en cristallographie aux rayons X et cryomicroscopie électronique (cryo-EM) favorisent le modèle « bourgeonnant ».[50–54]

Le complexe BAM, et en particulier BamA, est très conservé parmi les bactéries Gram-négatives et joue un rôle essentiel dans l'insertion des OMPs dans la ME. Un complexe BAM non-fonctionnel entraîne une accumulation toxique d'OMPs non-repliées dans le périplasme et une perte d'intégrité de la ME. De plus, les fonctions biologiques exercées par les OMPs, comme l'absorption de nutriments, des activités enzymatiques, l'adhésion et la signalisation cellulaires, seront affectées par la diminution des OMPs dans la ME.
BamA étant exposée à la surface des bactéries, elle est directement accessible aux molécules antibactériennes, ce qui permet d'éviter les problèmes de barrière de perméabilité et d'efflux.

Inhibiteurs

- Complexe BAM

Plusieurs composés inhibent le complexe BAM en interagissant directement avec BamA. Parmi eux, MRL-494 a été découvert lors d'un criblage de composés actifs sur *E. coli* sauvage (e.g., en présence d'une activité d'efflux basale et d'une membrane externe intacte). MRL-494 induit une diminution significative de la quantité des OMPs dans la ME, associé à une augmentation de l'activité du facteur de réponse au stress membranaire σ^E.[55] De plus, MRL-494 inhibe l'assemblage et la trimérisation de la porine LamB, ce qui est cohérent avec le fait que la MRL-494 interfère avec la maturation des OMPs médiée par BAM. La création de mutants *bamA* a permis l'identification de la mutation BamA^{E470K} conférant une résistance à MRL-494. Cette mutation n'empêche pas MRL-494 de se fixer à BamA mais restaure partiellement l'insertion de LamB sous forme trimérique dans la ME et empêche l'accumulation toxique des OMPs non repliées dans le périplasme.[55]
Une seconde étude a révélé le rôle essentiel des groupements guanidine de MRL-494 pour son activité antibactérienne et d'au moins un des deux groupements pour induire un stress membranaire et perméabiliser la ME.[56]
L'activité de MRL-494 a été démontrée sur plusieurs pathogènes à Gram-négatifs comme *E. coli*, *A. baumannii,* et *P. aeruginosa*. Cependant, le site d'interaction entre BamA et MRL-494 reste encore à définir, de même que le mode d'action de MRL-494 : direct sur l'assemblage des OMPs et/ou indirect sur les caractéristiques de la ME, notamment en lien l'adressage du LPS à la surface bactérienne (voir section « Complexe Lpt »).

Une autre petite molécule, VUF15259, a été identifiée suite au criblage de composés ciblant le système de sécrétion de type 5 des bactéries à Gram-négatif, impliqué dans la sécrétion de nombreux facteurs de virulence.[57] Bien que sa cible reste à déterminer, certains résultats suggèrent que VUF15259 altère la fonction de la machinerie BAM. En effet, les autotransporteurs ont besoin de BamA pour se replier et s'insérer dans les membranes.[58] De plus, VUF15259 entraîne une diminution du niveau de plusieurs OMPs dans la ME, modifie la perméabilité membranaire, et son activité augmente dans des mutants BAM.

BamA et BamD sont des composants essentiels du complexe BAM et interagissent directement dans l'espace périplasmique par l'intermédiaire du cinquième domaine POTRA de BamA.[59] Par conséquent, la perturbation chimique de cette interaction pourrait empêcher le repliement des OMPs et inhiber la croissance bactérienne. Ce phénomène a été illustré par un peptide dérivé de l'extrémité C-terminale de BamA, qui interfère avec le repliement de BamA dans un test de reconstitution *in vitro*.[59] Lorsque ce peptide est exprimé et exporté dans le périplasme d'*E. coli*, des défauts de croissance et une perméabilisation de la ME ont été observés, ce qui est cohérent avec l'inhibition de la formation du complexe BAM.[60] Un autre peptide a été synthétisé correspondant à la région conservée de BamD qui interagit avec BamA chez *P. aeruginosa*.[61] Ce peptide n'a pas d'activité antibactérienne mais potentialise l'activité de plusieurs antibiotiques, probablement en perméabilisant la ME.[61] Bien que ces peptides linéaires ne puissent pas être développés en vue de devenir de nouveaux candidats médicaments, ils mettent en évidence la possibilité de cibler l'assemblage du complexe BAM et fournissent de nouveaux outils pour explorer l'interface critique de BamA et BamD. Le couplage de cette approche avec les structures de l'interface BamA-BamD pourrait permettre la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. C'est le cas du composé IMB-H4 qui perturbe l'interaction BamA-BamD dans une approche en double hybride chez la levure.[62] Les essais de *pull-down* et d'inférométrie en bicouche (BLI ; *biolayer inferometry*) ont indiqué que cette perturbation était due à une interaction directe entre IMB-H4 et BamA. IMB-H4 présente une activité faible à modérée contre un panel d'agents pathogènes à Gram-négatif avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 4 et 32 µg/ml. En outre, IMB-H4 montre une activité synergique avec certains antibiotiques tels que la polymyxine B, la vancomycine et la gentamicine contre *E. coli*, probablement en raison de son activité perméabilisante sur la ME de cette espèce. Bien que ces résultats soient encourageants, il est nécessaire d'optimiser ce composé en augmentant son efficacité et en réduisant sa cytotoxicité.[62]

Compte tenu de la localisation de BamA à la surface bactérienne, Storek et al. ont recherché des anticorps monoclonaux ciblant les épitopes extracellulaires de BamA. Ils ont ainsi identifié MAB1, qui se lie à la boucle extracellulaire L4 de BamA et qui présente une activité bactéricide contre *E. coli ΔwaaD*, un mutant dont le LPS est tronqué.[63] MAB1 inhibe la biogénèse des OMPs et perturbe l'intégrité de la ME, mais uniquement lorsque la barrière formée par le LPS est défectueuse. Il est intéressant de noter que les mutants spontanés résistants à MAB1 contiennent des mutations dans *lpxM*, qui code pour une myristoyltransférase du lipide A.[63] Le double mutant Δ*waaD*, Δ*lpxM* présente une fluidité membranaire réduite par rapport à la souche parentale Δ*waaD*, suggérant que la rigidité de la ME est associée à la fonction de la machinerie Bam et à la résistance à MAB1. Malheureusement, MAB1 n'a pas de potentiel thérapeutique en raison de la fréquence élevée de mutants résistants ($>10^{-6}$) et d'une activité limitée aux souches ayant une fluidité membranaire anormalement élevée.[63]

D'autres études ont fait état de « nano-anticorps » (*nanobodies*) se liant aux boucles extracellulaires de BamA.[64] La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la cristallographie aux rayons X ont montré sur le nanoE6 se lie à la boucle extracellulaire L4 et que le nanoF7 se lie aux boucles L3 et L6 de BamA (Fig. 8A). En outre, les structures indiquent que ces deux nano-anticorps stabilisent la porte latérale de BamA respectivement dans un état ouvert et fermé. Malheureusement, aucun essai d'activité antibactérienne n'a été rapporté dans cette étude. Toutefois, on suppose que ces nano-anticorps bloquent la fonction de la machinerie Bam, entraînant une perte de l'intégrité de la ME et des défauts de croissance similaires à ceux induits par MAB1, dont le fragment de liaison à l'antigène (Fab1) bloque également BamA dans une conformation ouverte (Fig. 8B).[65]

L'un des inhibiteurs de BamA les plus prometteurs est probablement la darobactine, qui a été identifié par Imai et al. lors d'un criblage d'extraits d'isolats de *Photorhabdus*, un symbiote de microbiote intestinal du nématode, contre *E. coli*.[66] Ce produit naturel est un peptide synthétisé par voie ribosomale et modifié de manière post-traductionnelle, qui présente une puissante activité bactéricide contre un large panel de bactéries à Gram-négatif, y compris *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium* et *A. baumannii*.[66] La darobactine est inactive contre les bactéries à Gram-positif et n'a pas d'activité cytotoxique, ce qui démontre son haut niveau de spécificité. La darobactine est une grosse molécule (965 Da) et ne peut donc pas traverser la ME en empruntant les porines d'*E. coli*. Plusieurs éléments de preuve provenant de la microscopie, de l'analyse du transcriptome et du protéome suggèrent que la darobactine cible la ME. En effet, les mutants résistants d'*E. coli* contiennent tous des mutations dans *bamA*.[66] Une interaction spécifique et directe entre la darobactine et BamA a été démontrée par calorimétrie (ITC ; *Isothermal Calorimetry*) et la spectroscopie RMN a montré que la darobactine stabilisait très probablement BamA dans une conformation fermée, empêchant la sortie des OMPs naissantes vers la ME. En accord avec les résultats précédents, toutes les mutations conférant une résistance à la darobactine ont été localisées au niveau de la porte latérale de BamA.[66] Le mode d'action de la darobactine sur BamA a ensuite été élucidé par cryo-EM et cristallographie aux rayons X.[67] Dans cette étude, la darobactine adopte une conformation en brin β qui imite le signal β natif des OMPs et entre en compétition pour interagir avec la porte latérale entre les brins β1 et β16 de BamA (Fig. 8C). Ceci fige le canal dans sa conformation à l'état ouvert et empêche l'accès des polypeptides substrats.[67]
En parallèle, la darobactine a démontré son efficacité dans des modèles d'infection chez la souris, ce qui suggère qu'elle pourrait servir de piste prometteuse pour une optimisation plus poussée.[68] Sur cet aspect, plusieurs études se sont concentrées sur l'amélioration de l'activité et de la production de darobactine.[68–71] La darobactine est un heptapeptide (Trp-Asn-Trp-Ser-Lys-Ser-Phe) modifié par cyclisation post-traductionnelle. Le cluster génétique (BGC ; *biosynthetic gene cluster*) responsable de la biosynthèse de la darobactine se compose de *darA* codant pour le peptide précurseur, *darBCD* codant pour un transporteur ABC et *darE* qui code une enzyme à radical SAM (S-adénosylméthionine) responsable de la cyclisation.[72,73] Parmi ceux-ci, seuls *darA* et *darE* sont essentiels à la biosynthèse de la darobactine.[68] Ainsi, Groß et al. ont mis au point un système d'expression hétérologue contenant uniquement *darA* et *darE* chez *E. coli* afin d'améliorer la production de darobactine et de concevoir des variantes génétiques. Cette approche a conduit à l'identification de la darobactine 9, un dérivé non naturel qui s'est révélé plus efficace que la darobactine A contre plusieurs espèces pathogènes à Gram-négatif.[69] Dans une autre étude, Böhringer et al. ont examiné plusieurs génomes de la

clade des gamma protéobactéries.[70] Plusieurs orthologues de la darobactine A (darobactines B-F) ont été identifiés et exprimés individuellement dans *E. coli* en modifiant le système d'expression hétérologue décrit ci-dessus. Cette approche a conduit à l'identification de la darobactine B. Plus récemment, des structures obtenues par cryo-EM du complexe entre BamA et la darobactine 9 ont servi de modèle pour la génération de nouvelles darobactines par ingénierie biosynthétique.[71]
Parmi ces nouveaux dérivés, la darobactine 22 se lie plus étroitement à BamA et son activité est augmentée d'un facteur variant de 32 à 128 selon les bactéries testées. De plus, elle est particulièrement active contre *A. baumannii* résistant aux carbapénèmes (CRAB), classé parmi les agents pathogènes prioritaires par l'OMS, et ne présente pas de cytotoxicité.[71]
L'exploration des génomes bactériens à la recherche d'autres BGCs a permis l'identification d'un autre peptide, la dynobactine A.[74] Des essais d'activité antibactérienne ainsi que des analyses structurales obtenues par cryo-EM et cristallographie aux rayons X, suggèrent que la dynobactine A se lie à la porte latérale de BamA de la même façon que les darobactines malgré leurs structures différentes.

Quelques études rapportent les effets de molécules ciblant BamA sur la morphologie des bactéries. On remarquera (i) des foyers fluorescents au FM4-64 à la surface des bactéries traitées qui correspondent probablement à l'accumulation de matériel membranaire observée en microscopie électronique à transmission (MET) dans les mêmes conditions ; (ii) la perte de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne permettant l'accès du SYTOX Green à l'ADN cytoplasmique (Fig. 8D et 8E). Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que l'inhibition de BamA interfère avec la biogenèse de LptD, la protéine de ME en tonneau β responsable d'insertion terminale des molécules de LPS à la surface bactérienne (voir section suivante « Le complexe Lpt »). On remarque également que l'exposition des bactéries à la darobactine provoque un décollement de la membrane, puis un gonflement et une lyse des cellules (Fig. 8F).

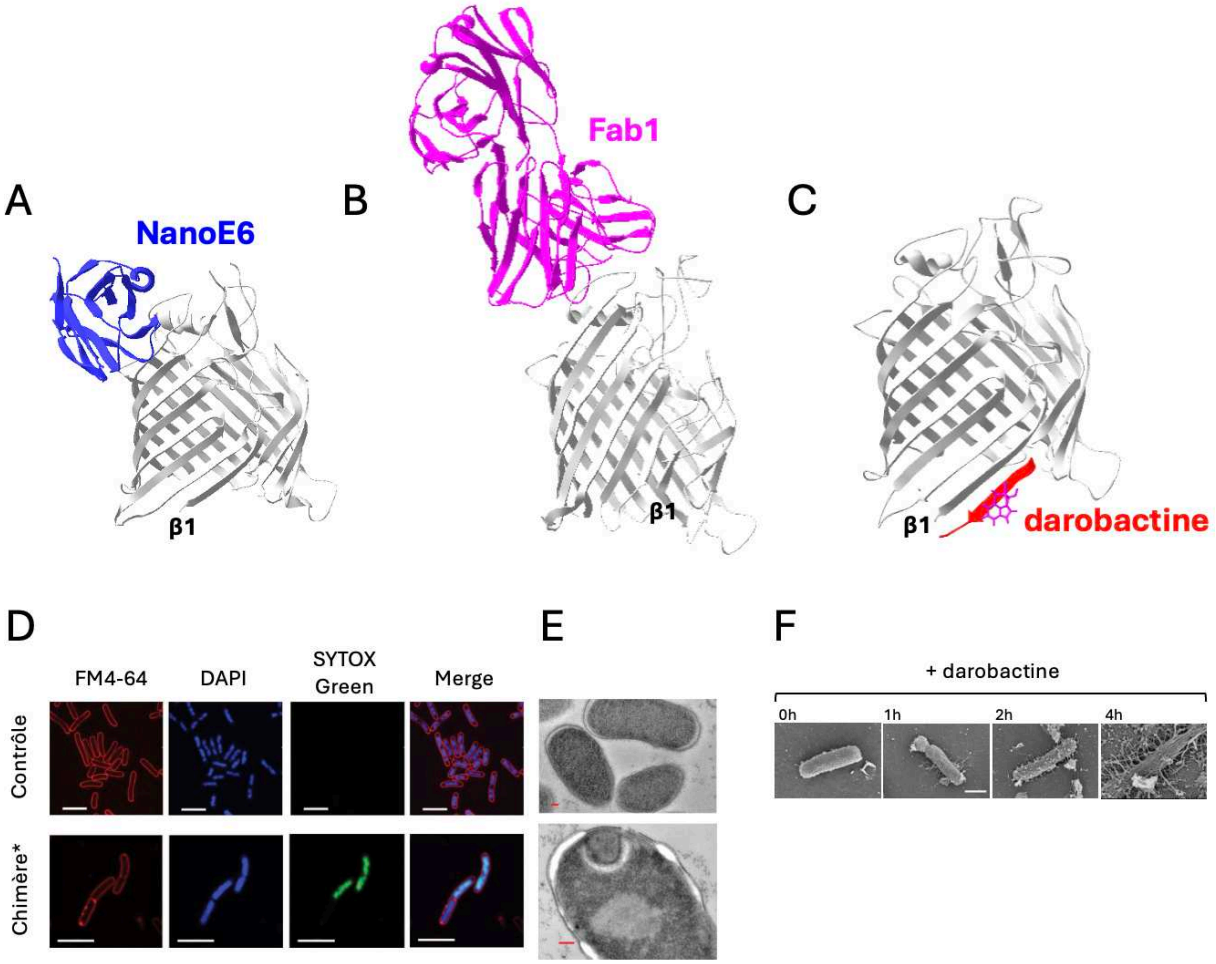


Figure 8 : Structures de BamA (gris) liée à de grandes et petites molécules (A-C) et effets de molécules inhibitrices sur la morphologie des bactéries (D-F). (A) NanoE6 (bleu) lié à la boucle extracellulaire 4 de BamA (PDB : 6QGW). (B) FAB1 (rose) lié à la boucle extracellulaire 4 de BamA (PDB : 7ND0). (C) darobactine (rouge) liée à BamA (PDB : 7NRI). Les figures A-C ont été générées avec PDB Viewer. (D) Images de microscopie à fluorescence de bactéries *E. coli* cultivées en absence (contrôle) ou en présence d'une molécule chimérique ciblant BamA (*chimère n°4 entre la murévapadine qui sera décrite dans la section « inhibiteurs de LptD » et la colistine qui sera décrite dans la section « peptides antimicrobiens ») puis marquées avec du FM4-64 (marqueur membranaire), du DAPI (marqueur perméant de l'ADN cytoplasmique) et du SYTOX Green (marqueur non-perméant de l'ADN cytoplasmique). Barres d'échelle : 4 µm. (E) Images en MET de bactéries *E. coli* cultivées dans les mêmes conditions. Barres d'échelle : 200 nm. (F) Images de microscopie électronique à balayage de bactéries *E. coli* exposées à la darobactine. *Figure adaptée de Luther A. et al. Nature, 2019 et de Imai Y. et al. Nature, 2019.*

2. Complexe Lpt

Description et fonctionnement

La biogénèse du LPS commence du côté cytoplasmique de la MI avant d'être basculé du côté périplasmique par le transporteur ABC MsbA (Fig. 9).[75] Le LPS est ensuite transporté vers la surface cellulaire par le complexe de transport Lpt (*LipoPolysaccharide Transport*), composé de sept protéines essentielles et conservées (LptA-G).[76] Le complexe $LptB_2FG$ localisé dans la MI fonctionne comme un transporteur ABC : les deux sous-unités cytoplasmiques LptB fixent et hydrolysent l'ATP, tandis que LptF et LptG forment les composants transmembranaires, chacun interagissant avec une sous-unité de LptB.[77] Une particularité de ce transporteur ABC est d'être associé à une autre protéine appelée LptC. LptC est une protéine périplasmique ancrée à la MI par une hélice transmembranaire unique insérée dans la cavité de liaison du LPS de LptFG, entre les hélices transmembranaires TM5 et TM1 de LptF et LptG respectivement.[78,79] La présence de LptC facilite l'entrée du LPS dans la cavité, où il interagit avec LptF, LptG et LptC. Il a été démontré que $LptB_2FGC$ existait dans deux états conformationnels : une conformation où l'hélice transmembranaire de LptC est située à l'intérieur du transporteur, et une autre où l'hélice s'éloigne de la cavité, un mouvement considéré important pour la libération du LPS du transporteur.[80,81]

L'hydrolyse de l'ATP par $LptB_2$ fournit l'énergie nécessaire pour transporter le LPS depuis la cavité de liaison jusqu'à la ME. Ce transport se fait via un pont périplasmique qui relie la MI et la ME par l'interaction des domaines en rouleau β (*β-jellyroll*) homologues de LptF, LptC, LptA et LptD dans une conformation « tête-à-queue », assurant un sillon hydrophobe continu pour que les molécules de LPS puissent traverser le périplasme aqueux.[82] Les domaines périplasmiques en rouleau β de LptF et LptC interagissent au niveau de leurs régions C- et N-terminales respectives. La protéine périplasmique LptA est le composant central du pont, qui relie LptC à LptD en interagissant avec les régions C-terminale de LptC et N-terminale de LptD. Bien qu'il ait été démontré que LptA s'oligomérisait *in vitro*, mais le nombre exact de monomères de LptA impliqués dans la formation du pont n'est pas encore résolu. Récemment, une étude a rapporté l'utilisation du logiciel d'intelligence artificielle AlphaFold2 pour prédire la structure du complexe LptCAD.[83] Le modèle obtenu suggère que le nombre de monomères de LptA dépend de la largeur du périplasme, qui peut varier au cours du cycle cellulaire.

Après avoir traversé le périplasme, les molécules de LPS sont transportées vers le feuillet externe de la ME par le translocon LptDE, qui se compose de LptD, une OMP en tonneau β, et de LptE, une lipoprotéine périplasmique ancrée au feuillet interne de la ME.[84] LptDE forme un complexe *plug-and-barrel* dans lequel LptE s'insère dans la lumière du tonneau β de LptD. LptD forme un nouveau type de tonneau β à 26 brins — le plus grand rapporté à ce jour. La structure, les simulations de dynamique moléculaire et les essais fonctionnels suggèrent que l'antigène O hydrophile et l'oligosaccharide central du LPS peuvent traverser le tonneau et que le lipide A du LPS peut être inséré dans le feuillet externe de la ME par une ouverture latérale entre les brins β1 et β26 de LptD.[85,86] Ces résultats nous aident non seulement à comprendre des aspects importants de la biogenèse de la ME, mais, comme nous l'avons vu pour BamA, présentent également un potentiel important pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes. Enfin, bien que son rôle ne soit pas encore bien défini, une étude a montré que LptE facilite la translocation du LPS à travers le tonneau β de LptD en permettant la dissociation des molécules de LPS avant leur transport.[87]

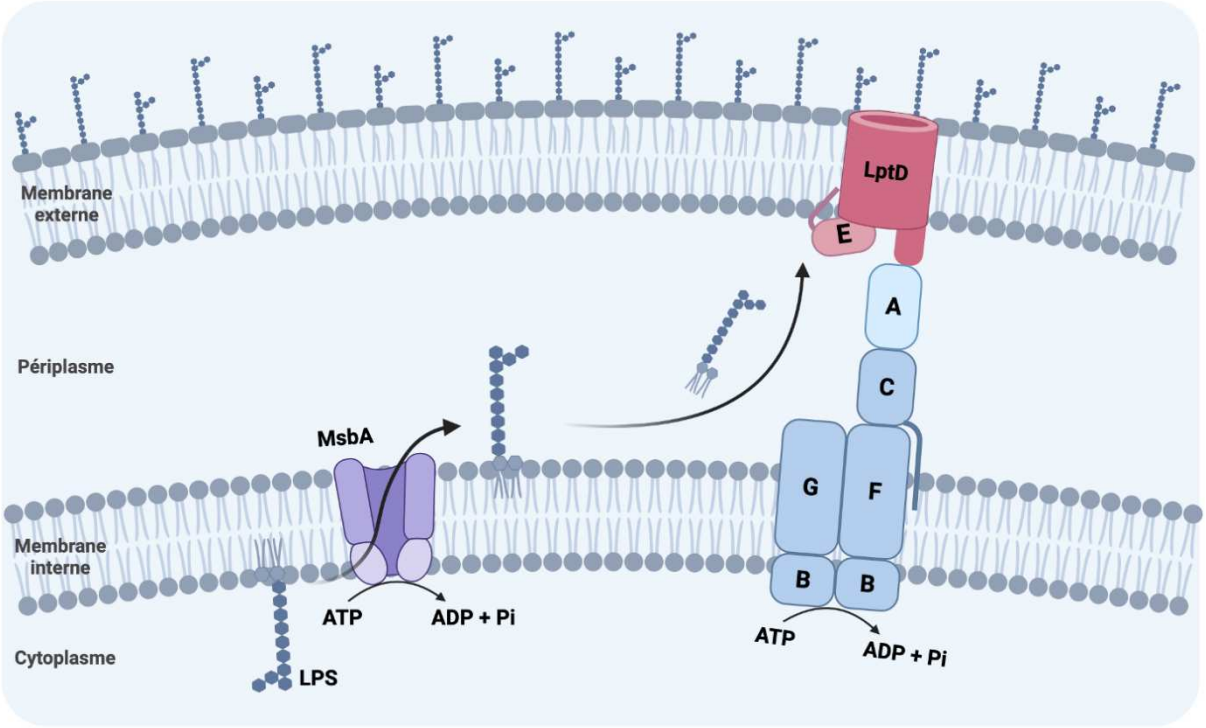


Figure 9 : Mécanisme de transport du LPS. MsbA, transporteur ABC/flippase ; LptA-G, complexe de transport du LPS. *Figure réalisée avec BioRender.*

Le système Lpt fonctionne comme une unité unique. En effet, les mutants d'*E. coli* dépourvus de tout composant du système Lpt présentent des phénotypes similaires : arrêt de la croissance bactérienne, accumulation de structures membranaires anormales dans le périplasme (voir ci-dessous et Fig. 10D-H) et de molécules immatures de LPS nouvellement synthétisé dans le feuillet externe de la MI.

En raison de son importance dans la physiologie des cellules bactériennes à Gram-négatif, la biogenèse des LPS est considérée comme une cible prometteuse. Des inhibiteurs de la biosynthèse du lipide A ont été identifiés dans des études antérieures et sont actuellement en cours de développement (par exemple, des inhibiteurs de LpxC.[88–92] En outre, des efforts considérables ont été déployés ces dernières années pour élucider le mécanisme moléculaire du retournement du noyau du lipide A par MsbA, et des inhibiteurs ont été identifiés.[93–96] Ces derniers ne seront toutefois pas abordés ici. Enfin, la compréhension croissante du mécanisme moléculaire sous-jacent au transport du LPS vers la ME par la machinerie Lpt a permis le développement de systèmes *in vitro* pour identifier et élucider spécifiquement le mode d'action des inhibiteurs des trois étapes critiques du processus, à savoir l'activité ATPase de LptB, l'assemblage du pont LptAC et la libération du LPS à la surface de la bactérie par LptDE.

Inhibiteurs

- LptD

LptD est la cible des inhibiteurs les plus prometteurs du transport du LPS. La protégrine-I (PG-I), un peptide en épingle à cheveux β, est un antimicrobien naturel cationique actif contre les bactéries à Gram-négatif, Gram-positif et les champignons.[97] En raison de son activité hémolytique sur les globules rouges humains, de nombreuses études de structure-activité ont été réalisées pour optimiser la molécule et réduire sa toxicité.[98–100] Ces études ont révélé que la nature amphiphile et la forme en épingle à cheveux de la PG-I étaient essentielles pour sa stabilité et son activité antimicrobienne. De plus, un nombre réduit de résidus chargés positivement a été corrélé à une diminution de la sensibilité des bactéries à Gram-négatif. Après plusieurs phases d'optimisation, des peptidomimétiques macrocycliques ont été sélectionnés avec une faible activité hémolytique et une forte activité antimicrobienne contre *Pseudomonas spp.*, y compris *P. aeruginosa*.[101] L'isolement de mutants résistants au dérivé POL7080 et des études de marquage par photo-affinité ont permis d'identifier LptD comme la cible bactérienne du peptide.[101] Plus récemment, le photo-marquage couplé à la spectrométrie de masse a permis de démontrer que le peptide se lie au segment périplasmique de LptD, qui contient le domaine en rouleau β et un domaine N-terminal caractéristique de *Pseudomonas spp* (Fig. 10A).[102] Avec un tel mode d'action, la liaison du peptide devrait ainsi bloquer le transport du LPS. Comme c'est le cas pour les mutants conditionnels *lptD*, l'exposition des bactéries de type sauvage au peptide entraîne une accumulation intracellulaire de matériel membranaire, un bourgeonnement de vésicules à la surface de la ME et des modifications du lipide A (e.g., une absence de désacylation médiée par PagL et d'acylation médiée par PagP ainsi qu'une augmentation de l'ajout de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose médié par ArnT), ce qui est cohérent avec l'inhibition du transport du LPS vers la surface bactérienne.[103] Les propriétés prometteuses du composé POL7080, rebaptisé Murépavadine, ont permis au peptide de terminer avec succès les essais cliniques de phases I et II pour une formulation injectable. Cependant, la phase III pour les patients atteints de pneumonies à *P. aeruginosa* a dû être interrompue en raison d'une incidence élevée de lésions rénales.[104] Actuellement, un essai clinique de phase I pour une formulation inhalée de Murépavadine mené par Spexis a été approuvé pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose.[104]

Dans l'objectif d'étendre la gamme d'activité de la murépavadine à des espèces à Gram-négatif autres que *P. aeruginosa*, Luther et al. ont synthétisé une série de composés chimériques en combinant un motif en épingle à cheveux β dérivé de la murépavadine et un macrocycle dérivé de la colistine[105] (cf. molécule chimère de la Fig. 8). Leur hypothèse reposait sur l'idée qu'une chimère entre la portion de la colistine se fixant au LPS et la portion de la murépavadine en épingle à cheveux β pourrait aboutir à une nouvelle molécule dont les propriétés antimicrobiennes (efficacité et spectre d'activité) seraient supérieures à celles de la murépavadine seule. En effet, les peptides chimériques synthétisés ont montré une activité bactéricide *in vitro* et *in vivo* chez la souris sur les pathogènes *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, dont des souches résistantes aux carbapénèmes et à la colistine. De plus, leur faible toxicité sur les cellules de mammifères et leur faible capacité à générer une résistance font de ces peptides des candidats antibiotiques prometteurs. Cependant, au lieu de cibler LptD comme attendu, la cible des peptides s'est avérée être BamA. L'interaction des peptides avec les boucles externes L4, L6 et L7 de BamA a été révélé par spectroscopie RMN. Également, la porte latérale de BamA se retrouve bloquée à l'état fermé.

- LptA-LptC

Découverte en 1996, la thanatine est un peptide antimicrobien provenant d'une punaise (*Posidus maculiventris*) doté d'une activité antibactérienne et antifongique à large spectre.[106] Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés dont la région C-terminale adopte une structure en épingle à cheveux β.[106] La thanatine est bactéricide contre *E. coli* mais n'induit pas d'effets de perméabilisation de la ME. Malgré le manque de connaissances concernant son mécanisme d'action, Vetterli et al. ont présenté d'autres preuves suggérant que la thanatine inhibe bien le transport du LPS chez *E. coli*.[107] En effet, l'exposition des bactéries à la thanatine induit une accumulation intracellulaire de matériel membranaire, typique d'un transport défectueux du LPS. En utilisant des expériences de marquage par photo-affinité, les auteurs de cette étude ont identifié LptD et LptA comme les cibles les plus probables du peptide.[107] Parallèlement, des mutations entrainant la résistance à la thanatine chez *E. coli* ont été localisées dans *lptA*.[107] La structure tridimensionnelle obtenue par RMN du complexe entre LptA et la thanatine a révélé que le brin N-terminal de l'épingle à cheveux du peptide se fixe en orientation parallèle au brin N-terminal du domaine en rouleau β de LptA (Fig. 10B).[107] Il est intéressant de noter que cette région est impliquée dans la dimérisation de LptA et dans son interaction avec LptC. L'hypothèse selon laquelle la thanatine cible la formation du pont périplasmique entre LptC et LptA a été confirmée à l'aide d'un test en double hybride bactérien et d'expériences de résonance plasmonique de surface (SPR ; *Surface Plasmon Resonance*) *in vitro*.[108,109]
La thanatine n'est pas un candidat médicament approprié pour un développement ultérieur en raison de ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques (ADMET ; Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicologie) ainsi que de l'émergence rapide de mutants résistants.[107] Cependant, de nouveaux dérivés ont été synthétisés présentant une puissante activité antimicrobienne contre les entérobactéries et des propriétés ADMET favorables dans un modèle d'infection murin.[110] En outre, ces candidats principaux se lient à LptA et à un mutant de LptA qui confère une résistance à la thanatine dans une gamme de concentrations de l'ordre du nM.[110] Ces observations valident le pont périplasmique du complexe Lpt comme une nouvelle cible antibactérienne. Toutefois, on peut faire valoir que ces molécules sont inactives contre d'autres agents pathogènes tels que *A. baumannii* en raison de la faible identité de séquence de la protéine cible LptA.

Une autre molécule ciblant l'interaction LptC-LptA est le dérivé de quinoléine IMB-881 découvert lors d'un criblage utilisant un système en double-hybride chez la levure.[111] IMB-881 montre une activité antibactérienne contre *E. coli* et des expériences de SPR ont permis d'identifier LptA comme cible de IMB-881, suggérant que ce composé peut lui aussi empêcher l'oligomérisation de LptA ainsi que la formation du pont périplasmique du complexe Lpt.

Plus récemment, une approche basée sur la spectrométrie de masse a été mise en place pour identifier de nouveaux inhibiteurs du transport du LPS, via la perturbation des interactions protéine-protéine formant le pont périplasmique du complexe Lpt.[112] Ainsi, une étude menée sur LptH, l'orthologue de LptA chez *P. aeruginosa*, a montré que la thanatine et IMB-881 sont des inhibiteurs efficaces de la dimérisation de LptH. L'étude des relations structure-activité de dérivés de IMB-881 est en cours afin d'identifier les déterminants moléculaires impliqués.

- $LptB_2FG$

Une famille de peptides macrocycliques a récemment été identifiée comme nouvelle classe d'antibiotiques ciblant la machinerie de transport du LPS.[113] Ces peptides sont très spécifiques d'*Acinetobacter* et présentent une activité similaire sur des souches de laboratoire et sur des souches cliniques multi-résistantes, y compris sur *A. baumannii* résistante aux carbapénèmes (CRAB ; *Carbapenem-Resistant Acinetobacter Baumannii*). En plus d'être prometteurs, ces résultats suggèrent que la cible de ces peptides n'est pas celle d'un antibiotique existant. En raison de leur faible compatibilité avec le plasma, ces peptides ont dû être optimisés, pour conduire à la zosurabalpine (RG6006). Son effet antibactérien a été testé et confirmé *in vivo* sur des modèles de souris infectées par une souche d'*A. baumannii* CRAB.[113] La zosurabalpine est actuellement évaluée dans le cadre d'essais cliniques mené par le laboratoire Roche.[114]
Des études de résistances induites et des tests biochimiques ont été réalisés afin d'identifier la cible de la zosurabalpine. Des mutations spontanées ont d'abord été identifiées dans le gène codant la protéine LptF qui entre dans la composition du complexe de MI. Des tests de libération du LPS à partir du complexe $LptB_2FGC$ reconstitué dans des protéoliposomes ont révélé que la zosurabalpine bloquait l'extraction du LPS à partir du complexe. Cependant, le complexe $LptB_2FGC$ contenant une version mutée de LptF peut supprimer l'activité de la zosurabalpine et rétablir le transport du LPS. Le mécanisme moléculaire par lequel la zosurabalpine et ses analogues inhibent le transport des LPS a été étudié plus en détail par cryo-EM avec les protéines homologues d'*A. baylyi*. Différentes structures obtenues révèlent que la zosurabalpine se lie à la fois au complexe $LptB_2FG$ et à la molécule de LPS en cours de transit.[115] La molécule de LPS, dont la présence est absolument nécessaire à la liaison de la zosurabalpine avec le complexe, se retrouve ainsi piégée dans le transporteur, bloquant tout le système de transport Lpt (Fig. 10C). Par ailleurs, les structures ont également révélé que le peptide se liait aux régions conservées du lipide A du LPS, indiquant que l'activité spécifique était due aux protéines LptFG.

Il est important de noter que le LPS n'est pas essentiel à la viabilité d'*A. baumannii*. Des études antérieures ont en effet démontré que plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse du LPS ne sont pas toujours essentiels, c'est-à-dire qu'ils peuvent être supprimés lorsque les étapes initiales de la biosynthèse sont bloquées.[116] Ceci explique les cas de résistance à la colistine rapportées dans des souches déficientes en LPS.[116] Il est probable que la zosurabalpine exerce son activité par l'accumulation toxique de LPS à l'intérieur des bactéries. Dans ce cas, la perte du LPS pourrait constituer un mécanisme de résistance.

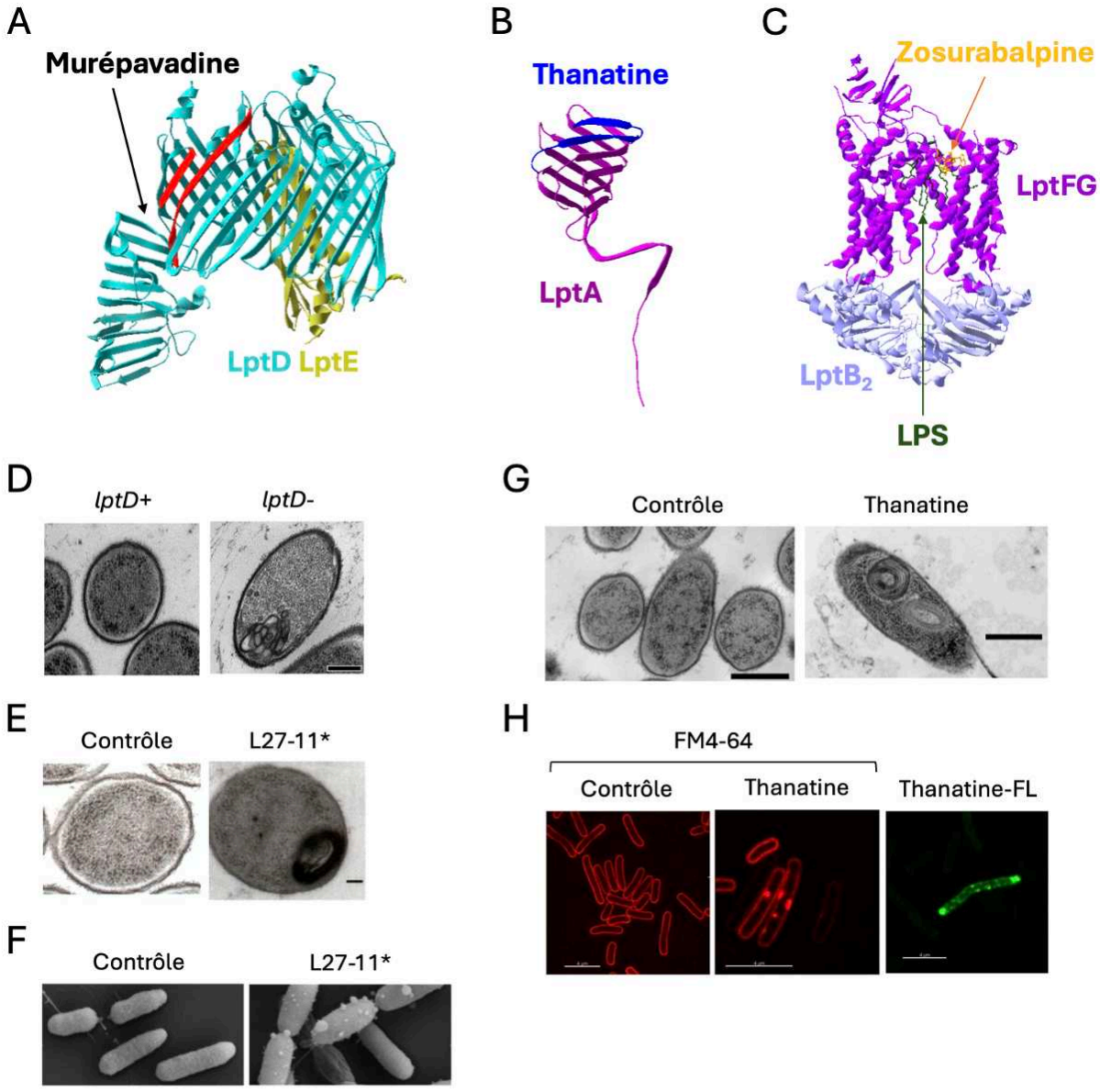


Figure 10 : Structures de LptA et des complexes LptDE et $LptB_2FG$ en interaction avec des petites molécules (A-C), et effet de molécules inhibitrices sur la morphologie des bactéries (E-H). (A) Complexe LptDE, les brins β1 et β26 sont indiqués en rouge (PDB : 4Q35). (B) Monomère LptA et thanatine (PDB : 6GD5). (C) Complexe $LptB_2FG$ associé à une molécule de LPS et à la zosurabalpine (PDB : 8FRN). Les figures A-C ont été générées avec PDB Viewer. (D) Images en MET de *P. aeruginosa* exprimant ou non LptD (*lptD+/-*). L'accumulation intracellulaire de matériel membranaire est observée pour le mutant *lptD-*. Barre d'échelle : 200 nm. (E,F) Images en MET (E) ou à balayage (F) de *P. aeruginosa* cultivée en présence ou en absence de L27-11 (*peptide macrocyclique dont sera dérivée POL7080/Murépavadine). Barre d'échelle : 100 nm (E). (G,H) Images en microscopie électronique à transmission (G) ou en fluorescence (H) de *E. coli* cultivée en présence ou en absence de thanatine. Barres d'échelle : 500 nm (G), 4 µm (H). *Figure adaptée de Werneburg M. et al. ChemBioChem. 2012 ; Srinivas N. et al. Science. 2010 ; Vertelli S. U. et al. Sci Adv. 2019.*

3. Complexe Lol

Description et fonctionnement

Les lipoprotéines sont des protéines modifiées de façon post-traductionnelle par des acylations successives permettant leur ancrage dans les membranes bactériennes. Les lipoprotéines périplasmiques peuvent être ancrées dans le feuillet interne de la ME ou dans le feuillet externe de la MI, tandis que les lipoprotéines exposées à la surface des bactéries sont ancrées dans le feuillet externe de la ME. Les lipoprotéines ont des fonctions très diverses. Certaines font partie des complexes de biogénèse BAM et Lpt, d'autres sont impliquées dans les voies de signalisation, l'import des nutriments, la division cellulaire, ainsi que dans des fonctions de virulence telles que l'adhésion cellulaire, la colonisation, l'invasion et l'évasion immunitaire.[117]

La lipoprotéine de Braun, également appelée Lpp, est la première lipoprotéine découverte et la plus abondante chez *E. coli*.[118] Lpp est ancrée dans le feuillet interne de la ME, et lie de manière covalente la ME au peptidoglycane, stabilisant ainsi la paroi bactérienne.

Les précurseurs des lipoprotéines synthétisés dans le cytoplasme contiennent en N-terminal une séquence signal pour leur translocation à travers la MI, qui se fait via le translocon Sec ou Tat.[119] L'extrémité C-terminale de la séquence signal contient un motif à quatre résidus appelé lipobox, défini par [LVI][ASTVI][GAS]C.[120] La cystéine en position +1, qui est le seul résidu réellement conservé du motif, est la cible de l'acylation lors de la maturation des lipoprotéines. Dans le périplasme, les lipoprotéines sont ancrées à la MI par leur séquence signal et sont maturées par l'activité de trois enzymes situées dans la MI et qui interviennent de façon successive. Premièrement, la diacylglycéryl transférase, appelée Lgt, ajoute un diacylglycérol au groupement thiol (-SH) du résidu Cys conservé.[121] Ensuite, LspA, également appelée signal peptidase II (SPaseII), clive la séquence signal, générant une apolipoprotéine diacylée avec la cystéine comme nouvel acide aminé N-terminal.[122] Enfin, la N-acyl transférase Lnt ajoute un troisième acide gras au groupement amine libre (-NH_2) du résidu Cys (Fig. 11).[123]

Dans le cas des lipoprotéines destinées au feuillet interne de la ME telle que Lpp, la lipoprotéine mature triacylée est exportée vers la ME via la voie de localisation des lipoprotéines (Lol). Le complexe Lol est composé du transporteur ABC LolCDE, de la protéine périplasmique LolA, et de LolB localisé dans la ME, qui sert de récepteur des lipoprotéines. La lipoprotéine est extraite de la MI par le complexe LolCDE.[124] L'énergie nécessaire est fournie par l'ATPase LolD qui hydrolyse l'ATP, permettant à LolE de se lier à la lipoprotéine et de la transférer à la chaperonne LolA recrutée par LolC.[125] Les chaînes acylées de la lipoprotéine s'insèrent dans la cavité de liaison hydrophobe de LolA pour former un complexe soluble qui va ensuite migrer vers LolB. LolB est un homologue structurel de LolA, possédant une affinité plus élevée pour les chaînes d'acides gras, ce qui assure le transfert unidirectionnel de la lipoprotéine de LolA à LolB.[126] LolB reçoit alors la lipoprotéine et l'incorpore dans le feuillet interne de la ME.[127]

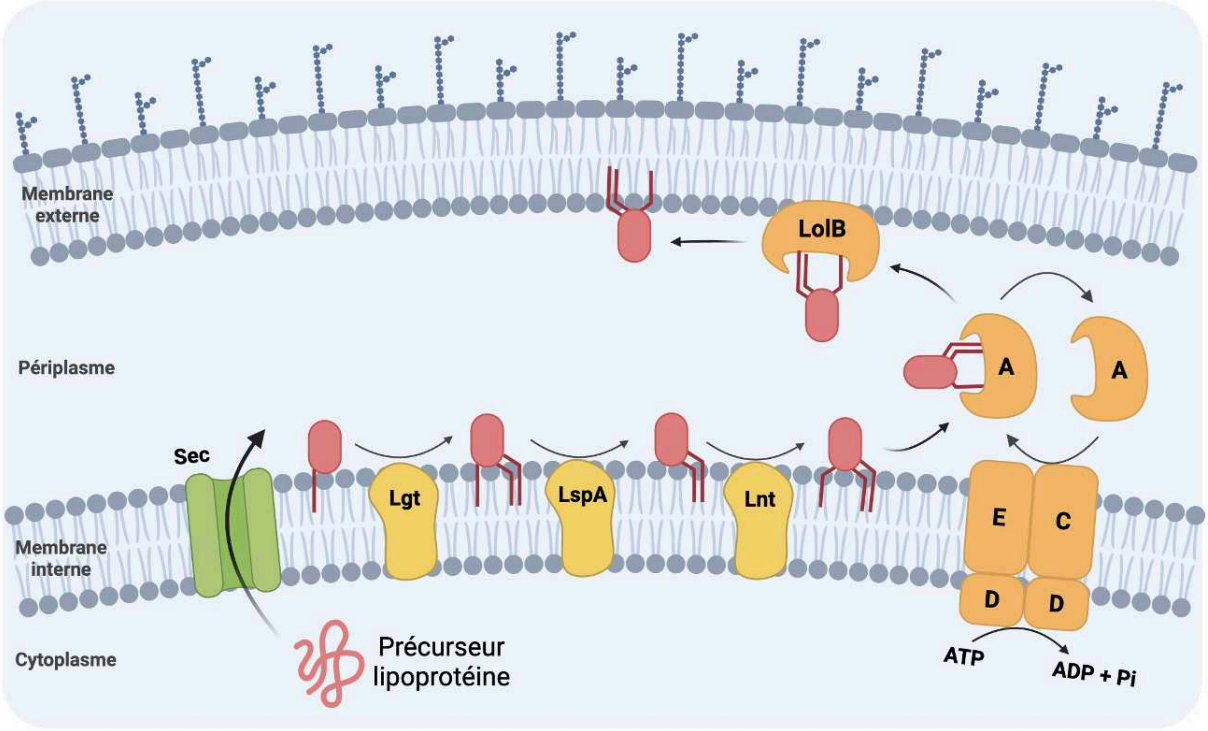


Figure 11 : Mécanisme de transport des lipoprotéines. Sec, translocon ; Lgt, diacylglycéryl transférase ; LspA, signal peptidase ; Lnt, N-acyl transférase ; LolA-E, complexe de transport des lipoprotéines. *Figure réalisée avec BioRender.*

Certaines lipoprotéines sont essentielles au fonctionnement des complexes de biogénèse de la ME, notamment BamD, LptE, et LolB pour les complexes Bam, Lpt, et Lol respectivement. L'interruption du trafic des lipoprotéines perturbe l'intégrité de la ME, pouvant induire la mort, ou du moins perméabiliser les bactéries, permettant ainsi l'activité d'antibiotiques non perméables.

Inhibiteurs

- LspA

Parmi les molécules antibactériennes naturelles produites par les *Streptomyces*, la globomycine est un peptide cyclique qui inhibe la maturation des lipoprotéines chez les entérobactéries en ciblant LspA.[128] Une étude a montré que des analogues de la globomycine présentant les chaînes latérales alkyle les plus longues avaient une meilleure activité antibactérienne contre des bactéries à Gram-négatif et Gram-positif.[129] La myxovirescine, un métabolite secondaire produit par les Myxobactéries, est un peptide cyclique également connu pour inhiber LspA.[130] Les co-structures cristallines de LspMrs (LspA de *S. aureus* résistant à la méticilline) avec la globomycine et la myxovirescine ont révélé que les molécules ciblaient toutes deux le site actif de l'enzyme et agissaient probablement comme des analogues non clivables.[131] Leurs groupes hydroxyles s'insèrent entre les aspartates catalytiques de la poche de liaison du substrat de LspMrs, mais leur macrocycle est associé à l'enzyme chacun à un côté opposé. De façon intéressante, en incluant le groupe hydroxyle, une suite de 19 atomes de la globomycine et de la myxovirescine se superposent lorsque les molécules sont liées à LspA. Ce motif, appelé « épine dorsale », pourrait contribuer au développement de futurs antibiotiques. Par ailleurs, le BGC responsable de la biosynthèse de la globomycine a été récemment identifié dans la souche productrice *Streptomyces sp*. CA-27895,[132] apportant de nouvelles informations pour la synthèse de dérivés. Cependant, les

résistances à la globomycine et à la myxovirescine sont très fréquentes. En effet, la toxicité de l'inhibition de LspA par ces composés est due à la formation de liaisons entre la Lpp mal localisée dans la MI et le peptidoglycane.[133] Ainsi, des mutations conduisant à l'absence de Lpp ou à son incapacité à se lier au peptidoglycane sont des mécanismes de résistance fréquents.[130,134]

- LolA

CCT-00431 et CCT-00432 sont les premiers inhibiteurs décrits ciblant la machinerie Lol grâce à une méthode de criblage combinant trois tests successifs sur la capacité des molécules à inhiber (i) la division bactérienne ; (ii) la croissance indépendamment de la présence de Lpp ; (iii) le relargage de lipoprotéines substrats de LolA dans des préparations de sphéroplastes.[135]
Plus tard, le composé MAC13243, a été identifié comme un nouvel inhibiteur de la croissance d'*E. coli* et dont l'activité était fortement diminuée par la surexpression de LolA.[136] L'interaction directe de MAC13243 avec LolA a été démontrée par spectroscopie RMN. Les CMI de MAC13243 contre des souches de laboratoire d'*E. coli* et *P. aeruginosa* sont relativement élevées (respectivement 16 et 8 µg/ml). Néanmoins, il est encourageant de constater que MAC13243 est peu sensible à l'efflux chez *E. coli* et reste létal pour de nombreux isolats cliniques multirésistants de *P. aeruginosa*, tout en présentant une faible cytotoxicité. En outre, MAC13243 a été identifié dans une étude indépendante lors d'un criblage de petites molécules perméabilisant la ME d'*E. coli*. Cette étude a notamment montré que MAC13243 sensibilisait *E. coli* à plusieurs antibiotiques de haut poids moléculaire, normalement incapables de traverser la ME.[137]
A l'heure actuelle, la question de savoir si des analogues de MAC13243 peuvent être utilisés en clinique reste sans réponse.

- LolB

LolB est une lipoprotéine essentielle. Une seule étude a fait état d'inhibiteurs de la protéine LolB de *Vibrio parahaemolyticus* à l'aide d'un criblage virtuel à haut débit.[138] Plusieurs molécules naturelles ont ainsi été identifiées (e. g., la procyanidine, stévioside, la troxérutine et la rutine) mais leurs activités antibactériennes sont là aussi relativement faibles. Des expériences en spectroscopie de fluorescence et des études de simulation d'interactions moléculaires ont confirmé l'affinité des composés avec LolB. Plus précisément, les inhibiteurs se fixent à l'entrée de la cavité hydrophobe de LolB, à l'endroit où se fixe la lipoprotéine substrat.[126] Deux résidus ont été identifiés comme jouant un rôle clé dans cette interaction. Cependant, une optimisation de ces composés est nécessaire afin d'améliorer leur efficacité antibactérienne à de plus faibles concentrations.

- LolCDE

La littérature rapporte l'identification de plusieurs inhibiteurs du complexe LolCDE. En 2015, l'industriel Astra Zeneca a mené deux campagnes de criblage pour identifier de nouvelles molécules antibactériennes. Les cribles phénotypiques à haut débit étaient basés soit sur un système rapporteur de défauts de la paroi cellulaire, soit sur l'inhibition de la croissance d'*E. coli*. Ces cribles ont conduit à la découverte de composés pyrazole (e.g., composé 2) et pyridineimidazole (e. g., G0507).[139,140] Ces deux types de composés induisent des changements morphologiques analogues à ceux observés avec la globomycine, y compris un gonflement des cellules, une réduction de la condensation des nucléoïdes et une augmentation de la perméabilité membranaire. En outre, il a été démontré que ces composés inhibent la libération de Lpp dépendante de LolA à partir

des sphéroplastes d'*E. coli*, et des mutations résistantes ont été localisées au niveau de LolC ou LolE.[139,140] Bien que la cible soit prometteuse, ces composés doivent être optimisés à de nombreux égards. Actuellement, la faible solubilité et la forte liaison aux protéines plasmatiques de ces composés ne sont pas adaptées pour une application thérapeutique chez les mammifères. L'activité antibactérienne de ces composés contre les bactéries à Gram-négatif n'est que modérée, probablement en raison de leur grande sensibilité à l'efflux et de leur spectre d'activité limité. Ils n'ont aucune activité contre *P. aeruginosa* en raison de leur incapacité à traverser la ME. D'autres caractéristiques limitantes sont la fréquence élevée de l'apparition de mutants résistants ($>10^{-6}$) et le rebond de la croissance bactérienne pendant les expériences de *time-kill*.[139,140]

- Lgt/Lnt

La résistance envers les inhibiteurs de LspA et de LolCDE est due à la perte de la protéine Lpp, empêchant son accumulation toxique dans la MI. Une étude récente a examiné le rôle de Lgt, la première enzyme du processus de maturation des lipoprotéines, dans la viabilité cellulaire. Les résultats montrent que de faibles niveaux de Lgt sont suffisants pour la croissance d'*E. coli*, mais que Lgt est essentielle à la viabilité, indépendamment de la présence ou de l'absence de Lpp.[141] En effet, l'absence de Lpp ne permet pas de restaurer la viabilité cellulaire lorsque Lgt est déplétée, comme c'est le cas pour LspA et LolCDE. L'étude du peptide macrocyclique G2824, identifié comme premier inhibiteur de Lgt, confirme ces conclusions. G2824 inhibe la croissance d'*E. coli*, augmente sa sensibilité aux antibiotiques, et son activité n'est pas affectée par la délétion de Lpp.[142] Ces résultats montrent que Lgt est une cible prometteuse et ouvrent la voie à de futurs inhibiteurs de Lgt.
Enfin, bien que Lnt soit une protéine essentielle, il n'existe à ce jour aucun inhibiteur de Lnt décrit dans la littérature.

La structure ainsi que la phase de développement de certaines de ces molécules sont rassemblées en fin chapitre d'introduction (Tableau 1).

II) Structure de la membrane externe

1. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMP ; *Antimicrobial Peptide*) sont de petites molécules naturellement produites par la majorité des organismes vivants, y compris les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Également connus sous le nom de peptides de défense de l'hôte, les AMP font partie du système immunitaire inné des animaux et permettent d'éliminer rapidement les agents pathogènes. La majorité des AMP sont des composés cationiques amphipathiques actifs sur les membranes biologiques, d'une longueur de 10 à 50 acides aminés. La charge positive nette des AMP est importante pour les interactions électrostatiques avec les lipides chargés négativement à la surface bactérienne (e.g., les molécules de LPS des bactéries à Gram-négatif et les acides (lipo)téichoïques des bactéries à Gram-positif), tandis que les résidus hydrophobes sont essentiels pour leur insertion dans les bicouches lipidiques.[143]
La gramicidine fut le premier AMP isolé, extrait de la bactérie téllurique *Bacillus brevis* en 1939.[144] Depuis, le nombre d'AMP découverts a augmenté de façon exponentielle, avec un nombre extrêmement élevé de publications faisant état de nouveaux AMP chaque année. En 2003, la base de données APD (*Antimicrobial Peptide Database*) (https://aps.unmc.edu/) fut créée et contenait alors 525 AMP. En janvier 2024, la base de données contenait 3940 peptides, dont des AMP isolés naturels, synthétiques et même prédits sur la base d'études génomiques. Les AMP peuvent être classés selon plusieurs critères, tels que leur source biologique ou leur fonction. En effet, ils peuvent être antibactériens, antiviraux, antifongiques, antiparasitaires, et peuvent également avoir des fonctions immunomodulatrices, être impliqués dans la cicatrisation de plaies, ou encore avoir des propriétés anticancéreuses, justifiant leur désignation de peptides de défense de l'hôte au sens large. D'autres critères de classification sont basés sur la séquence primaire des AMP, à savoir la longueur du peptide, la charge nette, le pourcentage de résidus hydrophobes et la composition en acides aminés. Bien que la structure tridimensionnelle de la plupart des AMP soit inconnue, ils peuvent être classés selon leur structure tridimensionnelle en hélice α, feuillet β, αβ ou non-αβ, et selon les méthodes biophysiques utilisées pour la détermination de la structure : spectroscopie RMN, dichroïsme circulaire ou cristallographie aux rayons X. Parmi les structures d'AMP connues, la structure α hélicoïdale est la plus répandue.

L'activité antibactérienne des AMP peut être divisée en deux catégories en fonction de leurs mécanismes d'action : les peptides ciblant la membrane et ceux ne ciblant pas la membrane.[145] Les peptides ne ciblant pas la membrane exercent une activité non-lytique et agissent généralement sur des cibles intracellulaires. Les peptides ciblant la membrane peuvent se distinguer les uns des autres selon leur interaction avec les lipides.
Deux modèles de perturbation des membranes faisant suite à la formation d'un pore sont connus : le modèle du « pore en tonneau » ou *barrel-stave* et le modèle du « pore mixte » ou *toroidal-pore*.[146] Dans les deux modèles, les monomères d'AMP se lient d'abord à la membrane dans une orientation parallèle à la surface, puis s'oligomérisent et s'insèrent verticalement dans la bicouche lipidique (Fig. 12A et 12B). Les modèles diffèrent dans la manière dont les AMP s'intègrent dans la membrane. Dans le modèle *barrel-stave*, les monomères forment un canal en forme de tonneau, où leurs régions hydrophobes interagissent avec les lipides, tandis que leurs régions hydrophiles font face à la lumière du pore transmembranaire formé (Fig. 12A). Dans le modèle *toroidal-pore*, les lipides se

courbent de façon que leurs têtes polaires s'associent aux régions hydrophiles des monomères pour former le pore (Fig. 12B).
Un troisième mécanisme n'impliquant pas la formation de pore est connu sous le nom de modèle « tapis » ou *carpet-like*. Les monomères d'AMP se lient à la surface de la membrane et la recouvrent, induisant la formation de micelles, comme le font les molécules de détergent, après avoir atteint une concentration seuil qui déstabilise la membrane (Fig. 12C).
Ces trois mécanismes sont basés sur la nature amphipathique des AMP qui leur permet de se maintenir à l'interface entre l'environnement extracellulaire soluble et les membranes hydrophobes.
Dans tous les cas, les AMP provoquent la perte d'intégrité des enveloppes bactériennes, avec des bourgeonnements membranaires à la surface des bactéries (Fig. 12D et 12E).

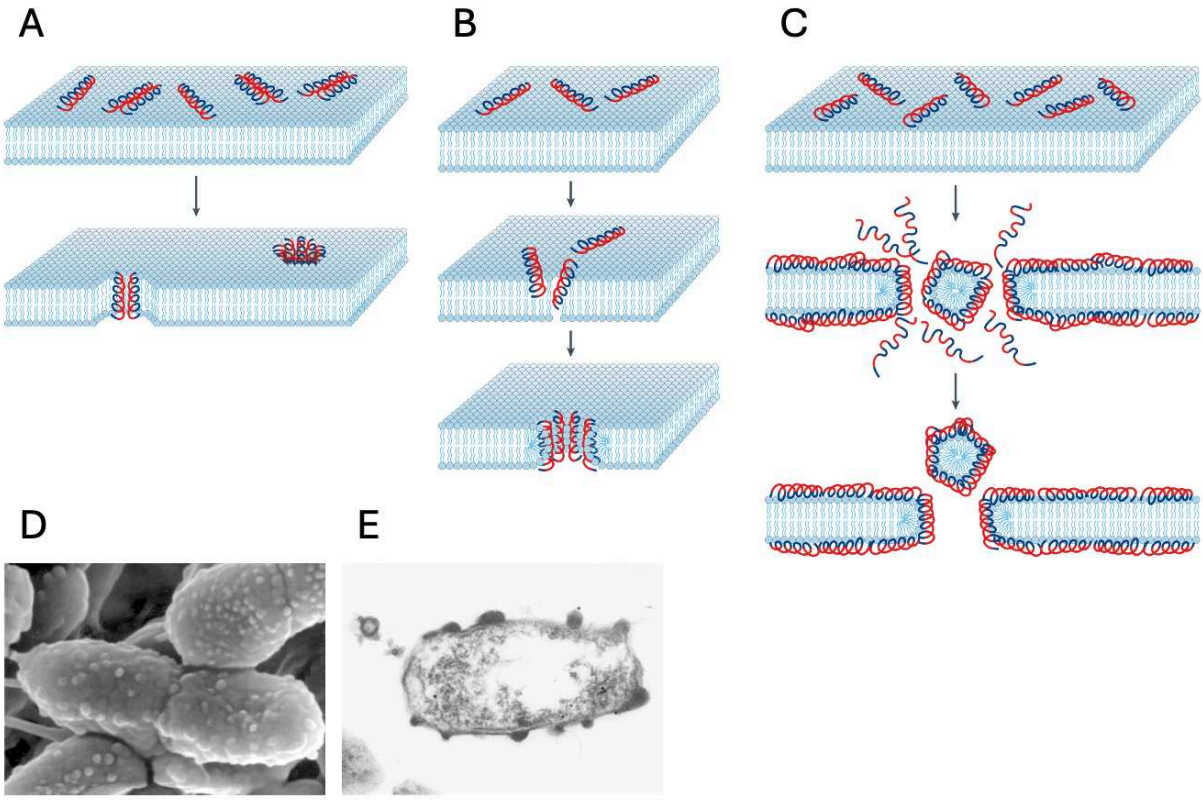


Figure 12 : Modèles d'insertion des peptides antimicrobiens dans les membranes bactériennes. (A) Modèle *barrel-stave*. Dans ce modèle, les peptides attachés s'agrègent et s'insèrent dans la bicouche membranaire de sorte que les régions peptidiques hydrophobes s'alignent sur la région centrale des lipides et que les régions peptidiques hydrophiles forment la région intérieure du pore. (B) Modèle *toroidal-pore*. Dans ce modèle, les peptides attachés s'agrègent et induisent une courbure des monocouches lipidiques le long du pore en formation, de sorte que l'intérieur du pore est tapissé à la fois par les peptides insérés et par les têtes lipidiques. (C) Modèle *carpet-like*. Dans ce modèle, les peptides perturbent la membrane en s'orientant parallèlement à la surface de la bicouche lipidique et en formant une couche étendue ou un tapis. Les régions hydrophiles et hydrophobes des peptides sont représentées en rouge et en bleu respectivement. (D,E) Observation en microscopie électronique à balayage (D) ou en transmission (E) de bourgeonnements de la surface bactérienne de *P. aeruginosa* dus à l'activité de la cathélicidine SMAP29, un AMP produit par les leucocytes de mouton. *Figure adaptée de Brogden K. A. Nature. 2005.*

Le paragraphe suivant présente des exemples d'AMP ciblant la structure de la ME des bactéries à Gram-négatif, notamment les polymyxines, qui comptent parmi les AMP les plus connus.

Les polymyxines sont des molécules naturelles découvertes dans les années 1940 chez la bactérie tellurique *Paenibacillus polymyxa* (également connue sous le nom de *Bacillus polymyxa*). Elles forment une classe de d'antibiotiques polypeptidiques et cationiques possédant une activité spécifique contre les bactéries à Gram-négatif. Deux polymyxines, la polymyxine B et la colistine (polymyxine E) sont utilisées en clinique, mais leur utilisation par voie systémique a été interrompue dans les années 1970 en raison d'une toxicité rénale et neurologique. Le développement de polymyxines de nouvelle génération ayant une activité contre les souches résistantes à la colistine et une toxicité plus faible que les polymyxines existantes suscite donc un grand intérêt.[147] Parmi elles, on citera SPR206, MRX-8 et QPX9003 dont les données d'efficacité *in vitro* et *in vivo* et les profils de toxicité sont particulièrement prometteuses (Tableau 1).[148]

Malgré leur toxicité, la polymyxine B et la colistine présentent une forte activité antibactérienne contre les pathogènes à Gram-négatif problématiques, notamment *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* et *E. coli*. La colistine et la polymyxine B ont de puissantes activités *in vitro* contre les entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.
Les polymyxines ont une structure typique composée d'un peptide polycationique cyclique et d'une chaîne tripeptidique acylée attachée à des acides gras à l'extrémité N-terminale (Fig. 13A). Les résidus cationiques d'acide diaminobutyrique (Dab) sont conservés dans toutes les polymyxines et interagissent avec les groupes phosphates chargés négativement du lipide A (Fig. 13B). Cette interaction déplace les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} qui relient un lipide A à un autre et contribuent à la stabilisation de la ME. À la suite de ces interactions électrostatiques, la chaîne d'acide gras et le motif hydrophobe se replient pour s'insérer dans la ME, provoquant sa rupture.[149] La colistine et la polymyxine B ne se distinguent que par la différence d'un seul résidu d'acide aminé dans l'anneau peptidique, la D-phénylalanine de la polymyxine B étant remplacée par un résidu de D-leucine dans la colistine (Fig. 13A).

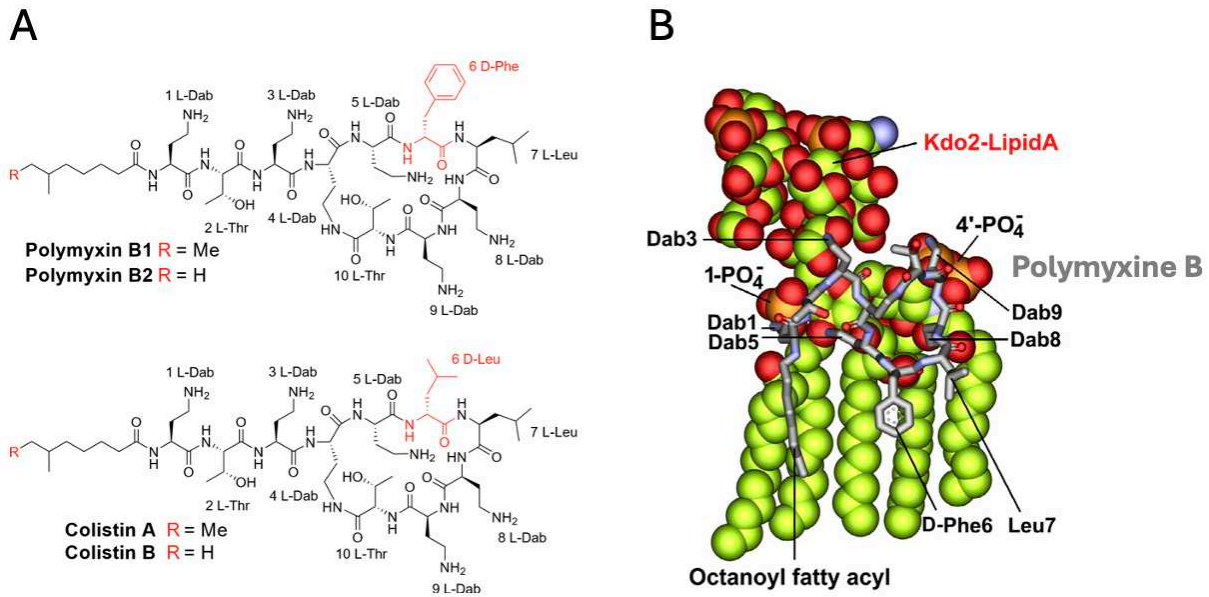


Figure 13 : Structure des anciennes polymyxines et interaction avec le LPS. (A) Structures de la polymyxine B1, de la polymyxine B2, de la colistine A et de la colistine B. Les deux principaux composants des médicaments commerciaux à base de polymyxine B et de colistine, respectivement. La polymyxine B et la colistine ne diffèrent que par un seul acide aminé en position 6 (en rouge). (B) Modèle moléculaire de l'interaction d'une molécule de polymyxine B avec le LPS montrant les principales interactions ioniques et hydrophobes des différents résidus. *Figure extraite de Roberts K. D. et al. Nat Comm. 2022.*

Si le mécanisme d'action des polymyxines sur la ME a été bien caractérisé, la façon dont elles interagissent avec la MI et induisent la mort cellulaire n'est toujours pas bien définie. En effet, les modèles précédemment décrits pour les AMP ciblant les membranes biologiques ne semblent pas convenir aux polymyxines. D'une part, la présence de LPS « sauvage » apparaît indispensable à l'activité des polymyxines : *in vivo,* les souches d'*A. baumannii* déficientes en LPS sont résistantes aux polymyxines[116] ; de même, les modifications des extrémités phosphate en positions 1 et 4' du lipide A par l'ajout d'un groupement L-4-aminoarabinose (L-Ara4N) ou phosphoéthalnolamine (pEtN) entrainent une résistance aux polymyxines dans certains mutants[150,151] ; *in vitro*, l'activité perméabilisante des polymyxines sur des vésicules lipidiques varie selon le pourcentage de LPS.[152] D'autre part, des expériences de microscopie à force atomique (AFM : *Atomic Force Microscopy*) sur des bicouches lipidiques planes n'ont pas montré d'activité formatrice de pores.[152] L'interaction des polymyxines avec la MI a été clarifiée par Sabnis et al. en montrant que la colistine ciblait aussi les molécules de LPS dans la MI lors de leur transport vers la ME.[153] De façon intéressante, les auteurs ont d'abord montré que la résistance à la colistine médiée par le gène *mcr-1* responsable de modifications du lipide A dans la MI[154], protégeait la MI mais pas la ME de perturbations dues à la colistine dans des tests de perméation utilisant la fluorescence du N-phenyl-1-naphthylamine (NPN) et l'iodure de propidium (PI).[153] Dans ces tests, le NPN et le PI sont des fluorophores non-perméants : le NPN devient fluorescent au contact des phospholipides exposés suite à une déstabilisation des molécules de LPS à la surface des bactéries et indique la perméabilisation de la ME, alors que le PI devient fluorescent au contact de l'ADN dans le cytoplasme bactérien et indique la perméabilisation de la ME et de la MI. Cette étude montre également que la murépavadine, décrite précédemment comme inhibiteur du transport du LPS, sensibilise *P. aeruginosa* à la colistine en augmentant l'abondance de LPS dans la MI.[153]

Le regain d'intérêt pour les polymyxines comme antibiotiques de dernier recours a relancé l'étude de leur mode d'action. L'activité première des polymyxines consiste essentiellement à perméabiliser la ME, tandis qu'elles provoquent la lyse bactérienne en interagissant avec le LPS au niveau de la MI. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activité des polymyxines n'ont pas encore été entièrement élucidés. Un modèle complexe à trois états de l'interaction polymyxine-lipide A a récemment été proposé.[155]

Les polymyxines sont des peptides non-ribosomiques (NRP ; *Non-Ribosomal Peptide*).[156,157] Les NRP renferment un grand potentiel antimicrobien, mais la grande majorité d'entre eux reste inconnue. Grâce à une approche d'exploration des génomes, une étude menée dans l'objectif de trouver de nouveaux NRP cationiques ciblant les pathogènes à Gram-négatifs, a abouti à la découverte de la brévicidine et de la latérocidine provenant de BGC nouvellement identifiés chez *Brevibacillus laterosporus*.[158] Ces deux lipopeptides cycliques présentent une activité antibactérienne contre les pathogènes à Gram-négatif du groupe ESKAPE, notamment *P. aeruginosa* et *E. coli* résistants à la colistine. L'étude du mode d'action de la brévicidine a révélé des cibles multiples, incluant le LPS dans la ME ; le phosphatidylglycérol et la cardiolipine dans la MI. La liaison de la brevicidine à ces cibles induit une perturbation de la force proton-motrice, conduisant à plusieurs perturbations métaboliques et à la mort des cellules bactériennes.[159] La multiplicité des cibles engendre un risque faible de développement de résistances. Ajouté à cela, la faible toxicité vis-à-vis de cellules humaines, l'effet thérapeutique notable dans des modèles d'infection chez la souris, et l'activité

antibactérienne rapportée chez des souches résistantes à la colistine, la brévicidine et la latérocidine suscitent un vif intérêt en tant que candidats antibiotiques. Cependant, en raison de difficultés à exprimer et à produire en grandes quantités ces composés naturels, des voies de synthèse alternatives sont étudiées pour la production d'analogues synthétiques.[160–164]

Il existe d'autres NRP qui ciblent en premier lieu le LPS, mais dont l'effet bactéricide est dû à leur interaction avec d'autres composants. C'est le cas des paenibactérines[165] et des relacidines[166], qui dépolarisent la MI et perturbent la biosynthèse de l'ATP respectivement. Également, la tridecaptine $TriA_1$, un lipopeptide linéaire cationique, interagit avec un précurseur du peptidoglycane, le lipide II, dans la MI et perturbe la force proton-motrice.[167] Découvertes en 1978, les tridécaptines représentent une nouvelle classe d'antimicrobiens isolés de *Paenibacillus polymyxa*.[168] En raison de leur faible activité comparée à celle des polymyxines, les tridécaptines ont longtemps été négligées mais l'émergence de souches résistantes à la colistine suscité un regain d'intérêt pour leur potentiel thérapeutique. Depuis 2014, des études de relations structure-activité sont conduites pour identifier des analogues présentant une activité antibactérienne efficace contre les bactéries résistantes à la colistine.[169]

Les exemples d'AMP mentionnés ci-dessus présentent des caractéristiques structurelles et des spectres d'activité communs. Il s'agit de lipopeptides cycliques cationiques isolés des genres *Paenibacillus* ou *Brevibacillus*, qui représentent une source attrayante de potentiels candidats thérapeutiques pour lutter contre les pathogènes à Gram-négatif.[170,171]

2. Molécules adjuvantes

En l'absence de nouveaux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif, une solution alternative est de combiner des antibiotiques existants incapables de traverser la ME et des composés perméabilisants. Ces composés, appelés adjuvants, ont peu ou pas d'activité antibactérienne intrinsèque mais potentialisent celle de certains antibiotiques et peuvent ainsi créer une multitude de nouvelles sensibilités. L'effet synergique de nombreux composés a été étudié avec les antibiotiques conventionnels actifs contre les bactéries à Gram-positif, afin de pouvoir les utiliser contre les bactéries à Gram-négatif.

La littérature fait état d'une grande variété de molécules adjuvantes. Une approche largement utilisée consiste à cribler des chimiothèques dans le but d'augmenter l'activité d'un ou de plusieurs antibiotiques contre une ou plusieurs espèces bactériennes. L'origine de ces chimiothèques est variée : il peut s'agir de nouvelles molécules naturelles, synthétiques ou semi-synthétiques ; de molécules antibiotiques ou non-antibiotiques déjà commercialisées comme agents thérapeutiques — on parle alors de repositionnement médicamenteux (*drug repurposing*).[172] D'une part, les combinaisons d'antibiotiques peuvent élargir le spectre antimicrobien et générer des effets synergiques.[173] D'autre part, la combinaison de médicaments non-antibiotiques avec des antibiotiques offre la possibilité de mettre en évidence des espaces chimiques bioactifs jusqu'alors inexploités.[174]

Les méthodes d'identification des composés antibiotiques ou d'adjuvants se répartissent en deux catégories distinctes : les cribles biochimiques *in vitro* contre une cible pré-identifiée connue pour être essentielle à la survie ou à la croissance bactérienne (soit de manière ubiquitaire, soit dans des conditions spécifiques), ou l'utilisation d'une approche sur cellules entières, dans laquelle un phénotype spécifique (mort cellulaire ou inhibition de la croissance) est utilisé pour identifier les composés les plus efficaces sans connaître le mécanisme d'action. Cependant, de nombreux exemples ont montré que résultats des criblages biochimiques ne se traduisent pas par une activité antibactérienne. Dans le cas des bactéries à Gram-négatif, cela s'explique par la barrière de perméabilité que représente leur membrane externe et l'efflux. Ainsi, les approches de criblage phénotypique sur cellules entières ont permis d'identifier de nombreux adjuvants (voir Fig. 14 pour le processus de criblage simplifié). Traditionnellement, une chimiothèque est fournie sous forme de composés secs disposés dans des microplaques à 384 puits. Elle est ensuite et solubilisée dans un solvant organique (généralement le DMSO) à une concentration finale de 10 mM. La chimiothèque est ensuite aliquotée dans des microplaques à 96 puits et diluée à une concentration de travail de 2 mM dans du DMSO, de sorte que les criblages sont effectués à une concentration d'adjuvant de 10 µM avec une concentration finale de DMSO de 0,5 % (v/v). Les plaques peuvent ainsi conservées à -80°C.

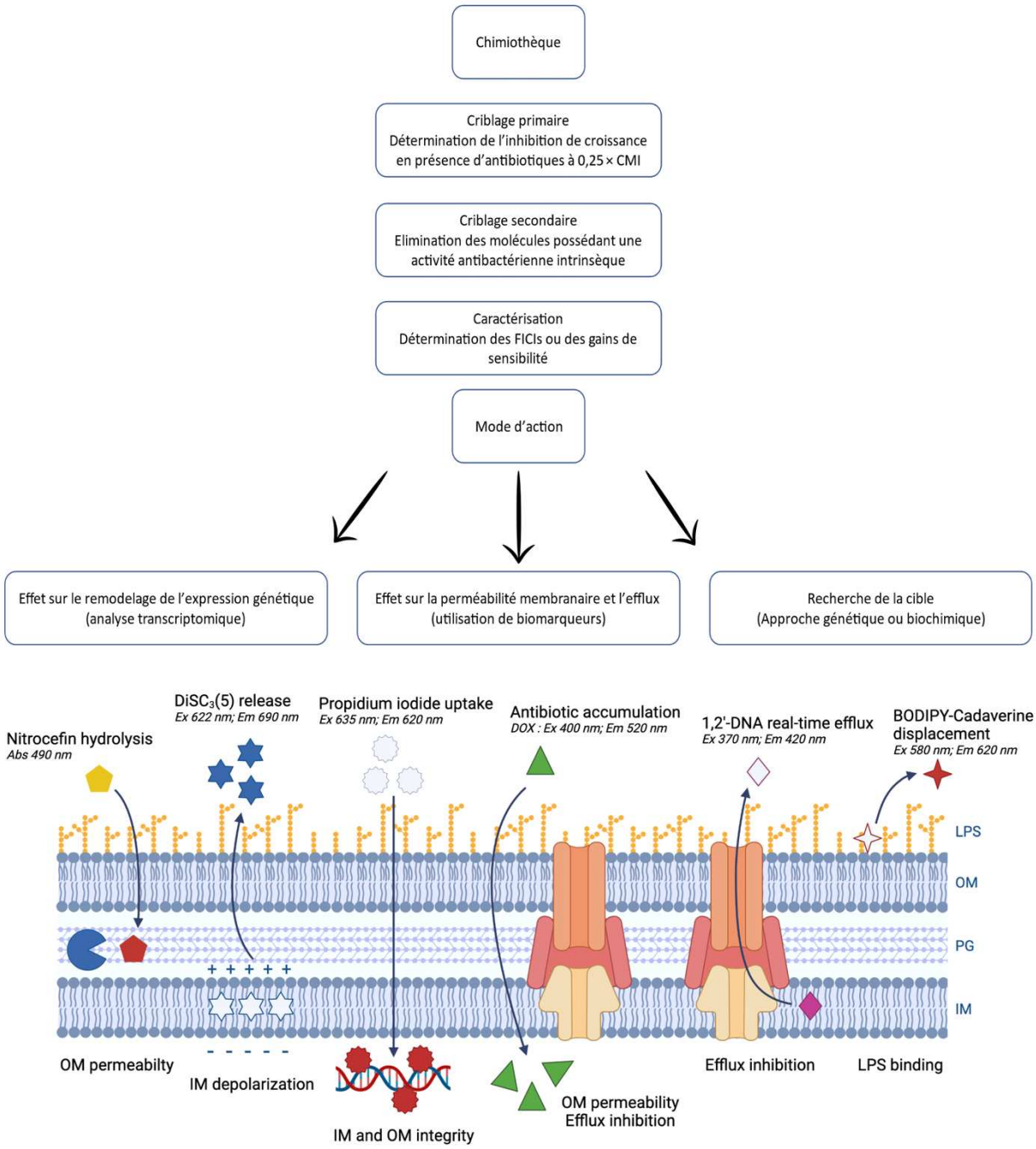


Figure 14 : Processus simplifié de criblage d'adjuvants. L'utilisation de biomarqueurs pour l'étude de l'effet des molécules sélectionnées sur la perméabilité membranaire et sur l'efflux est représentée de façon schématique. *Figure réalisée avec BioRender.*

On recherche alors des molécules permettant de réduire les doses efficaces, c'est-à-dire les CMIs, d'un ou de plusieurs antibiotiques sur une espèce bactérienne choisie. Une première sélection d'adjuvants est réalisée. Pour cela, des suspensions bactériennes (5×10^5 UFC/ml) dans un bouillon de Mueller Hinton ajusté en cations (MH2) sont disposées dans des plaques de 96 puits en présence d'un antibiotique à une concentration égale à ¼ de la CMI en présence ou en absence des molécules à cribler. Après incubation, la croissance bactérienne dans chaque puits est déterminée à l'œil ou à l'aide d'un marqueur de viabilité (lecture colorimétrique de la réduction d'iodonitrotétrazolium, INT). Après ce premier criblage, les composés actifs (ceux qui ont inhibé la croissance en combinaison avec l'antibiotique), sont soumis à un essai dose-réponse dans lequel la concentration de l'antibiotique est maintenue constante à la

concentration utilisée dans le criblage initial (¼ MIC) et la concentration du composé est réduite par rapport à celle utilisée dans le criblage initial afin de déterminer la concentration efficace la plus faible. Une caractérisation plus poussée de l'activité adjuvante des composés peut être réalisée en construisant des courbes de *time-kill*. Pour cela, des cultures bactériennes sont réalisées en présence et en absence d'antibiotique et d'adjuvant, des échantillons sont prélevés à différents temps, étalés sur gélose, incubés, et les UFC sont dénombrées. Les indices de concentration d'inhibition fractionnelle (FICI ; *Fractional Inhibitory Concentration Index*) peuvent être calculés pour les combinaisons d'antibiotiques avec les composés pour lesquels une valeur de CMI a pu être déterminée. Ceci permet de déterminer le degré de synergie de l'association. Enfin, le spectre d'activité peut être examiné en criblant les composés retenus contre un panel de souches bactériennes.

Comme indiqué précédemment, les approches de criblage phénotypique sur cellules entières nécessitent une détermination ultérieure du mécanisme d'action et l'identification de la cible biologique des composés. Dans le cadre de molécules actives sur les membranes bactériennes, on dispose de plusieurs tests biochimiques utilisant des marqueurs colorés ou fluorescents afin de déterminer leur impact sur l'efflux, la perméabilité de la ME et de la MI, la dépolarisation de la MI (Fig. 14). De nombreuses méthodes ont été développées pour mesurer l'efflux.[175] Traditionnellement, la mesure directe de l'efflux a été réalisée via une approche spectrofluorométrique impliquant l'utilisation de substrats de pompe d'efflux tels que le bromure d'éthidium, dont la fluorescence dépend son interaction avec l'ADN à l'intérieur de la cellule bactérienne. D'autres méthodes de suivi de l'efflux incluent l'utilisation du rouge de Nile ou du 1,2'-dinaphthylamine, deux fluorophores substrats des pompes, qui ne sont que faiblement fluorescents dans les solutions aqueuses mais qui deviennent fortement fluorescents dans les environnements hydrophobes, comme lorsqu'ils sont liés à des lipides intracellulaires.[176,177] Ces données peuvent être complétées par la mesure de l'accumulation intracellulaire d'antibiotiques substrats de pompes par fluorimétrie (dans le cas d'antibiotiques naturellement fluorescents ou modifiés par un fluorophore) ou par spectrométrie de masse (pour tous les antibiotiques).

L'effet d'un composé sur la perméabilité membranaire au sens large peut être mesuré à l'aide de tests basés sur la fluorescence, tels que BacLight™, développé comme un test de viabilité bactérienne qui s'appuie sur la perméabilisation de la MI comme marqueur de la non-viabilité bactérienne[178]. Les deux colorants du test, le SYTO-9 et l'iodure de propidium, présentent tous deux une fluorescence accrue lorsqu'ils interagissent avec l'ADN ; cependant le SYTO-9 est capable de traverser la MI intacte alors que l'iodure de propidium ne peut traverser que lorsque l'intégrité de la MI est perturbée.
La mesure de l'effet d'un composé sur la dépolarisation de la MI a été réalisée à l'aide du colorant fluorescent sensible au potentiel membranaire, le 3,5-dipropylthiacarbocyanine ($DISC_3$), qui s'accumule normalement dans la MI, et qui subit une augmentation de la fluorescence lorsqu'il est libéré à la suite d'une dépolarisation de la membrane[179].

Dans les paragraphes qui suivent, j'ai choisi de détailler le mode d'action de quelques exemples particulièrement prometteurs d'adjuvants ciblant la ME issues de campagnes de criblage (i) de nouvelles petites molécules synthétiques non-antibiotiques ; (ii) d'antibiotiques actifs sur des bactéries à Gram-positif ; (iii) de dérivés d'autres molécules antimicrobiennes dans le cadre d'un éventuel repositionnement médicamenteux.

Adjuvants découverts par le criblage de petites molécules synthétiques non-antibiotiques

Le peptide D-11 est un peptide synthétique contenant uniquement des acides aminés de la série D, ce qui lui confère une grande stabilité et une résistance aux protéases.[180] Des études *in vitro* ont montré que D-11 sensibilise plusieurs espèces bactériennes à Gram-négatif à la vancomycine et l'efficacité de la combinaison D-11/vancomycine a également été démontrée dans un modèle murin d'infection à *P. aeruginosa*.[181] De plus, D-11 sensibilise *P. aeruginosa* à un large panel d'antibiotiques.[182] Le peptide agit en perméabilisant à la fois la ME et la MI en se fixant au LPS et aux phospholipides. Cette interaction avec la MI est certainement responsable des effets observés tels que la dissipation de la force proton-motrice, l'inhibition des pompes d'efflux, la diminution du niveau d'ATP intracellulaire et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; *Reactive Oxygen Species*). Cependant, les effets provoqués par D-11 seul ne constituent pas la cause principale de la mort cellulaire étant donné sa faible activité antibactérienne. Il s'agirait plutôt de l'augmentation de l'accumulation des antibiotiques lorsqu'il est utilisé en combinaison.

Le peptide SLAP-S25 présente un profil assez similaire à celui de D-11. En effet, le peptide perturbe les membranes en ciblant respectivement le LPS et le phosphatidylglycérol dans la ME et la MI, et induit une diminution du niveau d'ATP et une accumulation de ROS dans les cellules.[183] Étant donné l'absence d'activité antibactérienne intrinsèque de SLAP-S25, l'accumulation d'antibiotiques liée à la perméabilisation des membranes est à l'origine de la mort cellulaire. En effet, la combinaison de SLAP-S25 avec plusieurs antibiotiques a démontré une bonne activité contre un isolat d'*E. coli* MDR (résistant aux carbapénèmes et à la colistine), et contre plusieurs isolats cliniques d'*E. coli* résistants à la colistine. Des études *in vivo* menées sur des modèles d'infection de *Galleria mellonella* et de souris ont confirmé l'efficacité de SLAP-S25 combiné à la colistine contre la souche *E. coli* MDR. Une étude supplémentaire a montré que l'activité de SLAP-S25 pouvait être étendue à d'autres antibiotiques et contre plusieurs pathogènes à Gram-négatifs MDR, à savoir *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*.[184]

Le criblage d'une chimiothèque de peptides α hélicoïdaux a permis d'identifier KL-L9P, qui parmi l'ensemble des peptides, présente l'activité hémolytique la plus faible.[185] KL-L9P est capable de sensibiliser *E. coli* à de nombreux antibiotiques utilisés contre les bactéries à Gram-positif. Des expériences *in vivo* sur un modèle d'infection cutanée par *A. baumannii* chez la souris ont confirmé la capacité de KL-L9P à potentialiser les activités antibactériennes de la rifampicine, du linézolide et de la clarithromycine. D'autres études *in vivo* ont montré que KL-L9P associé à la colistine augmentait le taux de survie des souris infectées par *E. coli* ou *P. aeruginosa* MDR par comparaison à la colistine seule. Il est intéressant de souligner que KL-L9P sensibilise des souches d'*E. coli* résistantes à la colistine à la rifampicine, au linézolide et à la clarithromycine. L'étude de son mécanisme d'action a révélé que KL-L9P se liait au lipide A sans endommager les membranes, mais en induisant un réarrangement de la membrane qui affecte sa fluidité et permet ainsi à l'antibiotique de pénétrer dans la bactérie.

Des antibiotiques comme adjuvants

D-LANA-14 est un composé appartenant à une classe d'analogues aliphatiques de la norspermidine conjugués à des lysines (LANA ; *Lysine Aliphatic Norspermidine Analogues*) et qui possède une forte activité antibactérienne contre *S. aureus* résistant à la méticilline.[186] Son activité bactéricide est due à la perméabilisation de la membrane cytoplasmique chez les bactéries à Gram-positif. Cela a naturellement conduit la communauté à étudier ses propriétés adjuvantes chez les pathogènes à Gram-négatifs. *A. baumannii* et *P. aeruginosa* sont deux espèces naturellement résistantes à la tétracycline et à la rifampicine. La combinaison de ces antibiotiques avec D-LANA-14 a démontré être efficace.[187] L'étude du mode d'action de D-LANA-14 a indiqué une perméabilisation de la ME et une dépolarisation du potentiel membranaire.

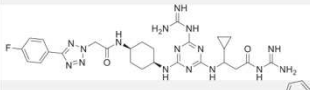
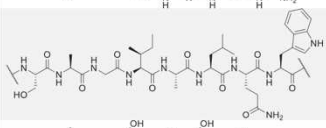
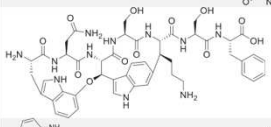
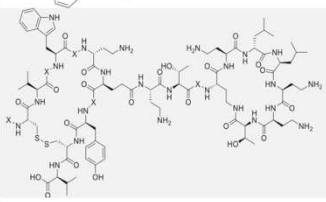
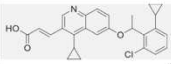
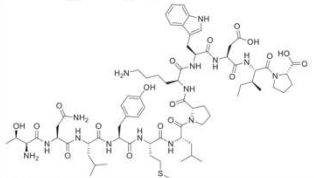
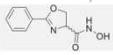
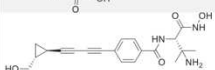
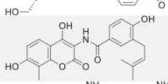
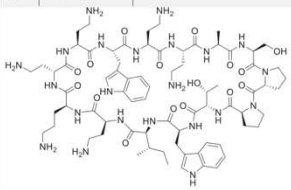
Une nouvelle classe de molécules a été récemment rapportée sous le nom de lipoguanidines.[188] Ces composés amphiphiles possèdent de bonnes activités antibactériennes contre les bactéries à Gram-positif mais sont peu actifs contre les bactéries à Gram-négatif. Des études de synergie avec la rifampicine et la novobiocine ont identifié le dérivé 5g comme composé le plus prometteur. En effet, il potentialise fortement l'activité des deux antibiotiques chez *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. coli* suite à la perturbation de leur ME. De plus, parmi tous les composés testés, le composé 5g présente le meilleur profil cytotoxique.

Des analogues d'antibiotiques comme adjuvants

Le peptide P35 est un analogue de la pentamidine, une molécule déjà commercialisée comme anti-protozoaire et antifongique.[189,190] Comme la pentamidine, P35 potentialise l'activité de la novobiocine chez *A. baumannii in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'infection murin. Outre la novobiocine, P35 potentialise l'activité de plusieurs autres antibiotiques, y compris la rifampicine, de façon plus importante et avec un spectre plus étendu par rapport à la pentamidine. De façon intéressante, l'association P35-novobiocine est très active contre des souches d'*A. baumannii* et de *K. pneumoniae* porteuses de gènes de résistance à la colistine. Logiquement, le mécanisme d'action des deux composés est similaire, à savoir la perturbation de la ME due à leur interaction avec le lipide A du LPS. P35 affiche une toxicité réduite pour les cellules de mammifères par rapport à la pentamidine mais des études de sureté doivent encore être menée.

Le peptide NAB741, découvert par Northern Antibiotics Ltd. et publié en 2010[191], possède le même noyau heptapeptidique que la polymyxine B mais sa chaîne latérale est constituée d'acétyl-thréonyl-D-sérinyl. En conséquence, ce composé ne porte que trois charges positives, contre cinq pour les anciennes polymyxines. NAB741 ne possède pas non plus la queue d'acide gras hydrophobe présente dans les anciennes polymyxines. En 2015, Spero Therapeutics a acquis la licence de NAB741 et l'a renommé SPR741. Par la suite, SPR741 a fait l'objet d'un développement très poussé et est entré en 2016 en étude clinique de Phase I. Malgré les données pharmacocinétiques et de tolérabilité positives, les essais cliniques de Phase II n'ont jamais été annoncé et SPR206 est devenu le nouveau dérivé polymyxine en cours de développement (Tableau 1).
Concernant le mode d'action de SPR741, des observations en AFM ont montré des « ondulations » et/ou des ruptures de la ME d'*E. coli*.[192] Aucun impact substantiel n'a été constaté sur la MI en utilisant le test de relargage du $DISC_3$ et de libération d'ATP. Deux

études en MET suggèrent que SPR741 induit des décollements de la ME ainsi que la formation de bourgeonnements qui émergent de la ME et qui pourraient correspondre à des vésicules. Grâce à leur activité perméabilisante, les polymyxines sont connues pour potentialiser l'activité de nombreux antibiotiques. Ainsi, SPR741 a montré une forte synergie avec la rifampicine et la clarithromycine contre *E. coli, K. pneumoniae, E. cloacae et A. baumannii*. Les facteurs de potentialisation contre ces bactéries, en présence de 4 µg/ml de SPR741, vont de 16 à plus de 2000 pour la rifampicine et de 6 à 340 pour la clarithromycine. Une synergie marquée a également été observée avec l'azithromycine, la mupirocine, l'acide fusidique et la vancomycine contre la plupart de ces espèces bactériennes. Ces résultats ont ensuite été corroborés par Corbett et al. en 2017.[193] Sur les 35 antibiotiques testés, les CMI de huit d'entre eux ont été réduites de 32 à 8000 fois contre *E. coli* et *K. pneumoniae* en présence de SPR741. On retrouve ici la rifampicine, des macrolides, et des antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram-positif tels que l'acide fusidique.
Les modifications apportées à SPR206 ainsi qu'aux autres polymyxines en cours de développement (MRX-8 et QPX9003) ont principalement permis d'optimiser leur propriétés pharmacologiques.

Composé	Structure	Cible	Stade de développement	Références (https://clinicaltrials.gov/)
Composés ciblant la biogenèse des OMPs				
MRL-494		BamA	Pré-clinique	55
Peptide dérivé de la séquence C-terminale de BamA (SAGIALQW)		BamD	Pré-clinique	60
Darobactine		BamA	Pré-clinique	66
POL7306 (X = acides aminés non-spécifiques)		BamA	Pré-clinique	194
Composés ciblant la biogenèse du LPS				
G907		MsbA	Pré-clinique	93
RJPXD33		LpxA/LpxD	Pré-clinique	195
L-573,655		LpxC	Pré-clinique	196
ACHN-975		LpxC	Essais cliniques IV arrêtés pour cause de toxicité cardiaque (Achaogen)	90,197
Dérivés de la novobiocine		LptB	Pré-clinique	198
Murépavadine (POL7080)		LptD	Essais cliniques IV arrêtés pour cause de toxicité rénale Phase I achevée ; inhalation ; infections respiratoires à *P. aeruginosa* (Spexis)	101

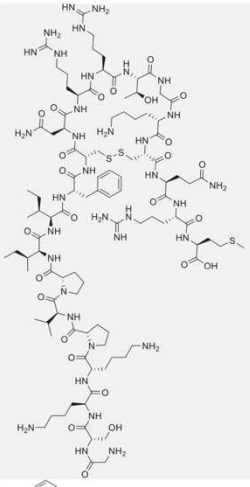
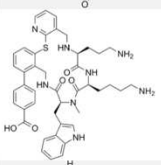
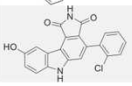
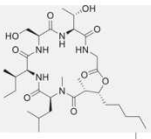
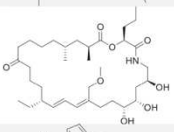
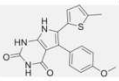
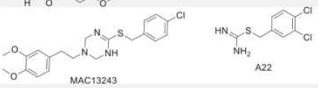
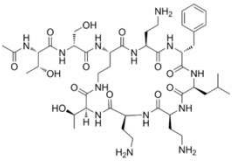
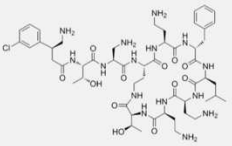
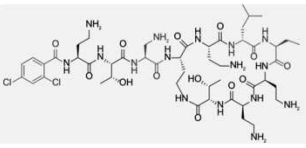
Thanatine		LptA/LptC	Pré-clinique	107
Zosurabalpine		$LptB_2FG$	Phase I en cours ; IV ; infections systémiques à *A. baumannii* (Roche)	113
4-phénylpyrrolcarbazole		$LptB_2FG$		199
Composés ciblant la biogenèse des lipoprotéines				
Globomycine		LpsA	Pré-clinique	131
Myxoviréscine		LpsA	Pré-clinique	130
G0507		LolCDE	Pré-clinique	140
MAC13243, A22		LolA	Pré-clinique	136,200
Composés ciblant l'intégrité de la membrane externe				
Dérivé polymyxine (SPR-741)			Phase I achevée ; Essais cliniques arrêtés (Spero Therapeutics)	192,193,201-204
Dérivé polymyxine (SPR-206)			Phase II en cours; IV ; Gram-négatives dont entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (Spero Therapeutics)	205-208
Dérivé polymyxine (MRX-8)	Aucune structure disponible		Phase I achevée ; IV ; Gram-négatives dont entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (MicuRx)	209,210
Dérivé polymyxine (QPX9003)			Phase I en cours; IV ; Gram-négatives dont entérobactéries, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes (Qpex Biopharma)	211

Tableau 1 : Liste (non-exhaustive) de composés en cours d'étude, visant à perturber la membrane externe des bactéries à Gram-négatif.[90,194–211]

Sur les quelques 50 petites molécules antibactériennes approuvées depuis 2000, seules six appartiennent à de nouvelles classes chimiques : le linézolide (2000, oxazolidinone), la daptomycine (2003, lipopeptide), la fidaxomicine (2011), la bédaquiline (2012, diarylquinoline), l'avibactam (2015, inhibiteur de β-lactamases) et le vaborbactam (2017, inhibiteur de β-lactamases). Bien qu'aucun de ces six médicaments n'ait d'activité cliniquement pertinente contre les bactéries à Gram-négatif, les inhibiteurs de β-lactamases sont utilisés en association avec les β-lactamines pour traiter ce type d'infections. La plupart des autres molécules antibactériennes approuvées sont issues de l'optimisation de molécules déjà existantes. En d'autres termes, après 70 ans de recherches intensives, la communauté scientifique se retrouve face à une limite à l'exploration de nouveaux espaces chimiques. En outre, certaines molécules antibactériennes récemment approuvées n'ont pas réussi à fournir le retour sur investissement attendu : des ventes décevantes, un approvisionnement trop rapide en génériques, et des coûts supplémentaires pour entreprendre de nouveaux essais cliniques et des essais de phase IV. Par conséquent, la rareté des antibiotiques innovants en cours de développement, en particulier ceux qui sont basés sur de nouveaux espaces chimiques et/ou ceux qui ciblent de nouveaux processus bactériens, suscitent de vives inquiétudes.

Comme je l'ai exploré dans cette introduction bibliographique, il existe une multitude d'approches prometteuses à différents stades de développement et d'autres à des stades conceptuels plus précoces. Plutôt qu'un manque d'idées novatrices, c'est l'absence de ressources financières et structurelles suffisantes qui est responsable de notre retard en termes de découverte et développement de molécules antibactériennes. Les équipes de recherche académiques et les petites entreprises qui identifient une nouvelle combinaison composé/cible ont rarement la capacité et/ou l'expérience spécialisée en matière de développement d'antibiotiques qui leur permettraient d'atteindre les objectifs fixés. Cette situation contraste fortement avec le déploiement de milliers de chercheurs dans les grandes entreprises pharmaceutiques qui soutenaient une vaste infrastructure pendant « l'âge d'or » des antibiotiques (Leaving the Lab: Tracking the Decline in AMR R&D Professionals - AMR Industry Alliance). Il est impératif que les informations sur les avantages et les écueils des projets innovants soient partagées avec la communauté mondiale afin d'éviter de gaspiller des ressources précieuses en réinventant la « roue cassée ». Il est à espérer qu'une plus grande prise de conscience mondiale de la nécessité d'améliorer les stratégies de remboursement des antibiotiques ravivera l'intérêt commercial pour ces programmes en phase de démarrage et aboutira à l'approbation d'antibactériens innovants qui répondront aux besoins médicaux futurs.

Contexte et description du projet

L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif représente une barrière à l'accumulation intracellulaire des antibiotiques dont dépend leur efficacité. Cette accumulation est contrôlée par deux flux opposés : une diffusion passive limitée à travers la membrane externe, et un efflux actif vers le milieu extérieur. Les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques présentent souvent une diminution de la perméabilité membranaire associée à une surexpression des pompes d'efflux.
Le sujet de ma thèse s'inscrit dans le cadre de l'utilisation de molécules adjuvantes capables de perméabiliser la membrane externe ou d'inhiber l'efflux, permettant de restaurer l'accumulation d'antibiotiques.

En 2009, la laboratoire MCT rapportait l'identification du géraniol (Fig. 15B), un alcool isoprénique issu de l'huile essentielle de la plante *Helichrysum italicum* (Fig. 15A) (connue sous le nom d'Immortelle d'Italie), capable de restaurer l'activité de nombreux antibiotiques substrats de l'efflux chez plusieurs bactéries à Gram-négatif multi-résistantes aux antibiotiques.[212]
Suite à cette découverte, une chimiothèque composée de molécules solubles et dérivées de la géranylamine (Fig. 15C) fut synthétisée.[213] En 2016, le criblage de cette chimiothèque a conduit à l'identification d'une molécule polyamino-isoprénique nommée NV716 (Fig. 15D), capable de sensibiliser *P. aeruginosa* PAO1 à la doxycycline, un antibiotique vis-à-vis duquel cette espèce bactérienne est naturellement résistante.[214]
Suite à la mise en œuvre de plusieurs tests biochimiques visant à déterminer le mode d'action de NV716, il a été montré que NV716 induisait une forte inhibition de l'efflux. Toutefois, il a également été observé une dépolarisation de la membrane interne, ainsi qu'une perméabilisation partielle de la membrane externe en présence de NV716. Les pompes d'efflux dépendant du gradient de protons pour fonctionner, il a été par conséquent suggéré que l'inhibition de l'efflux mesuré devait être en partie dû à la dépolarisation de la membrane interne. De plus, la perturbation de la membrane externe peut également être à l'origine d'une déstabilisation des pompes d'efflux conduisant à l'inhibition de leur fonctionnement.

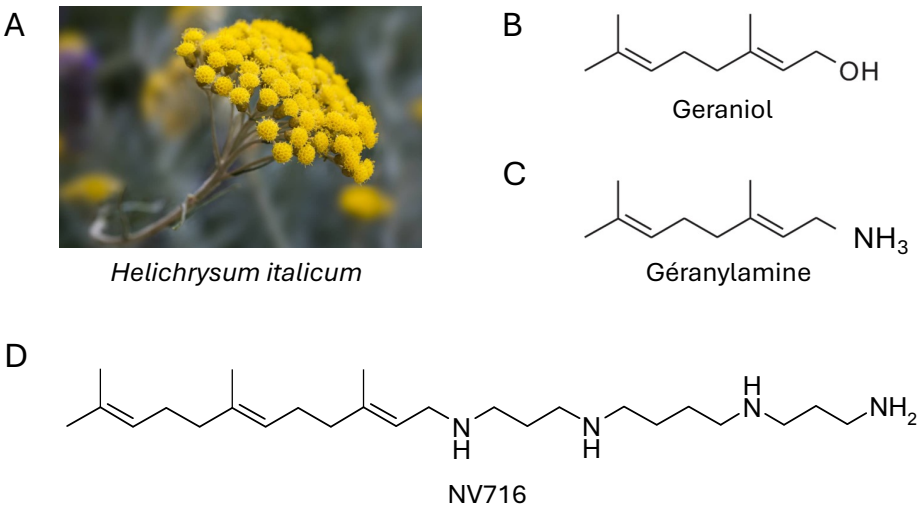


Figure 15 : Origine et structure du composé NV716. (A) Photo de l'Immortelle d'Italie. (B-D) Structures du géraniol (B), de la géranylamine (C), et de NV716 (D).

L'objectif principal de ma thèse a été d'approfondir l'étude du mode d'action de NV716. Dans un premier temps, j'ai étudié l'impact de NV716 sur l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine et de la doxycycline chez les bactéries à Gram-négatif *P. aeruginosa* et *E. coli*. Puis dans un second temps, j'ai cherché à comprendre l'activité de NV716 par différentes approches d'imagerie.

P. aeruginosa et *E. coli* font partie des pathogènes classés prioritaires par l'OMS en termes de résistance aux antibiotiques.[2] Par ailleurs, l'intérêt porté à *P. aeruginosa* est dû au caractère hautement imperméable de son enveloppe qui la rend naturellement résistante à de nombreuses classes d'antibiotiques.[215,216] Concernant les antibiotiques étudiés, le choix de la doxycycline s'inscrit dans la continuité de l'étude parue en 2016, démontrant la création d'une nouvelle sensibilité chez *P. aeruginosa* en présence de NV716. En ce qui concerne la ciprofloxacine, il s'agit d'un antibiotique très utilisé en clinique, et le seul antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolones actif sur *P. aeruginosa*.

Les fluoroquinolones possèdent des propriétés de fluorescence naturelle qui ont été l'élément déclencheur d'une collaboration entre l'unité MCT et la ligne de lumière DISCO du Synchrotron SOLEIL (voir ci-dessous). Les fluoroquinolones fluorescent lorsqu'elles sont exposées à un rayonnement ultraviolet (UV), ce qui permet de suivre au cours du temps leur accumulation dans des bactéries isolées, par microscopie à fluorescence UV sur la ligne DISCO.[217] Cette approche permet de comparer l'accumulation d'antibiotiques entre des souches génétiquement différentes (n'exprimant plus ou surexprimant des porines et/ou des pompes d'efflux par exemple), et peut également être utilisée afin de tester l'efficacité de molécules adjuvantes.
Les fluoroquinolones étant substrats des pompes d'efflux, cette approche fut historiquement utilisée pour comparer l'accumulation de plusieurs fluoroquinolones dans des souches exprimant différents niveaux d'efflux.[218]

La seconde partie de ma thèse porte sur un projet qui consiste à quantifier et localiser un dérivé métallique de la ciprofloxacine dans des bactéries isolées d'*E. coli*, par microscopie à fluorescence aux rayons X.

Synchrotron SOLEIL

Le synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE) est un accélérateur de particules circulaire dédié à la recherche scientifique académique et industrielle. Un schéma simplifié du synchrotron est représenté ci-dessous (Fig. 16).

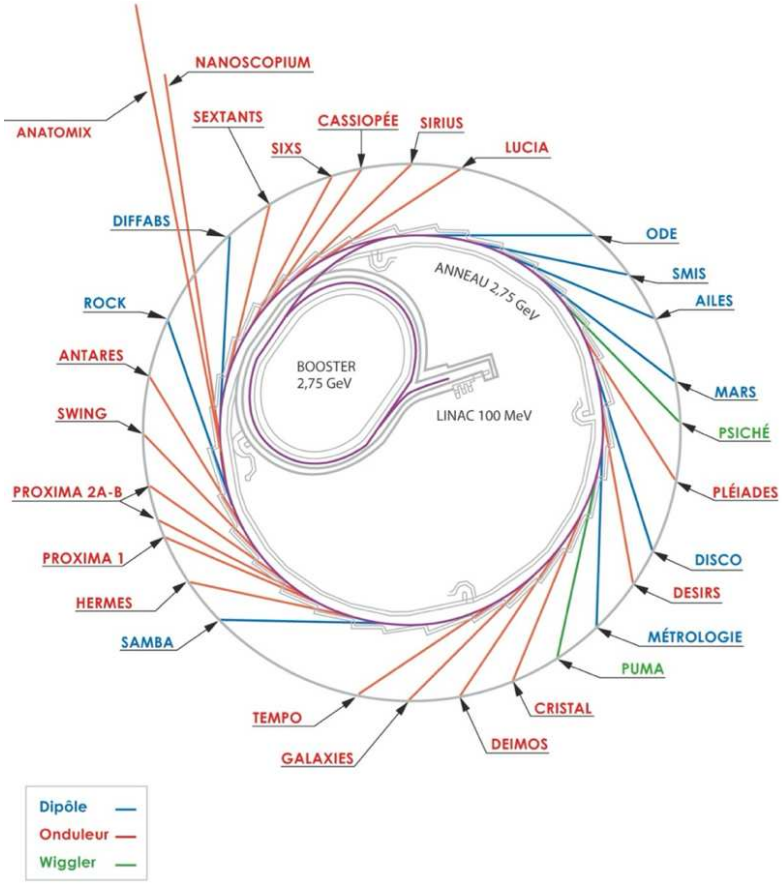


Figure 16 : Représentation schématique du Synchrotron SOLEIL

Les électrons sont issus d'une plaque de métal (tungstène), de laquelle ils sont arrachés et groupés en paquets avant d'être accélérés dans le LINAC (LINear ACcelerator), un accélérateur linéaire d'une quinzaine de mètres, jusqu'à atteindre une énergie de 100 MeV et une vitesse proche de la célérité. Les paquets d'électrons relativistes sont ensuite injectés dans le *booster*, un accélérateur circulaire qui permet aux électrons d'augmenter leur énergie jusqu'à la valeur souhaitée de 2,75 GeV, puis les électrons vont finalement être injectés dans l'anneau de stockage où ils vont être maintenus à énergie constante. L'anneau de stockage, qui mesure 354 mètres de circonférence, est en réalité un polygone. Au niveau de chaque angle du polygone se trouve un dipôle, ou aimant de courbure, qui dévie les électrons de leur trajectoire. A chaque passage dans un aimant, les paquets d'électrons perdent de l'énergie sous forme de photons. Cette lumière produite pulsée (352 MHz), extrêmement brillante, appelée rayonnement synchrotron, couvre une large gamme de longueurs d'onde allant des rayons X aux infrarouges, en passant par les ultraviolets et le visible.

Les lignes de lumière situées tout autour de l'anneau reçoivent chacune un faisceau de photons en ligne droite, qui sera ensuite focalisé en bout de ligne sur l'objet à étudier. Chaque ligne possède des caractéristiques spécifiques selon le type d'échantillon et la technique d'analyse. Des systèmes optiques présents sur chaque ligne de lumière permettent de sélectionner la gamme de longueur d'onde souhaitée.
SOLEIL est pourvu de 29 lignes de lumière dont la plupart exploitent les rayons X. La ligne de lumière DISCO est la seule à couvrir une gamme de longueurs d'onde allant des UV profonds au visible (60-700 nm).

La ligne de lumière DISCO (Dichroïsme, Imagerie, et Spectroscopie pour la Chimie et la biOlogie) a la particularité d'être divisée en deux branches. Une station expérimentale de dichroïsme circulaire d'une part, et d'autre part une station expérimentale d'imagerie. La branche de SRCD (Synchrotron Radiation Circular Dichroism) / OCD (Oriented Circular Dichroism) permet d'étudier la structure secondaire de protéines ou d'acides nucléiques, leur repliement ou encore leur insertion dans des membranes biologiques ou artificielles. La branche d'imagerie dispose de deux microscopes, Polyphème et Telemos. Le premier est un microscope confocal couplé à un spectromètre qui permet de suivre les variations spectrales et spatiales de la fluorescence dans l'échantillon. Le second est un microscope plein champ qui permet l'acquisition rapide d'images à environ 100 nm de résolution spatiale. Il peut être utilisé pour suivre au cours du temps des processus dynamiques dans des cellules vivantes. Un aspect important de l'imagerie sur DISCO est l'absence de marquage des échantillons. En effet, les techniques se basent sur la fluorescence émise par des fluorophores naturellement présents dans l'échantillon après excitation dans les UV.

Il existe aujourd'hui des dizaines de synchrotrons répartis dans le monde, possédant chacun des paramètres qui leur sont propres (circonférence de l'anneau, énergie des électrons, courant dans l'anneau, etc.). Deux synchrotrons sont présents en France, le synchrotron français SOLEIL situé sur le plateau de Saclay en région parisienne, et l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), le synchrotron européen situé à Grenoble.
Pendant ma thèse j'ai pu me rendre plusieurs fois à l'ESRF et à ALBA, le synchrotron espagnol situé près de Barcelone, dans le cadre de temps de faisceau.

Résultats et discussion

Partie 1 : Étude du mode d'action du dérivé polyamino-isoprénique NV716

I) Effet de NV716 sur l'activité antibactérienne d'antibiotiques

L'étude de la molécule NV716 a commencé par l'évaluation de son activité potentialisatrice lors de tests de sensibilité. Ces tests consistent à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques chez les bactéries, en présence ou en absence de NV716. Les CMI de la ciprofloxacine (CIP) et de la doxycycline (DOX) ont été déterminées chez les souches sauvages AG100 de *E. coli* et PAO1 de *P. aeruginosa*, ainsi que chez leurs mutants dérivés AG100A et PA403 dont les pompes d'efflux majoritaires ont été génétiquement inactivées (Tab. 2).

		CMI CIP (µg/mL)		CMI DOX (µg/mL)	
	NV716	-	+	-	+
Escherichia coli	AG100	0,016	0,008	1	0,125
	AG100A	0,004		0,25	
Pseudomonas aeruginosa	PAO1	0,128	0,064	64	1
	PA403	0,008		1	

Tableau 2 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de la ciprofloxacine (CIP) et de la doxycycline (DOX) chez *E. coli* et *P. aeruginosa* en absence (-) ou en présence (+) de NV716 à 10 µM. AG100, PAO1 : souches sauvages ; AG100A : AG100 Δ*acrB* ; PA403 : PAO1 Δ*mexAB*, Δ*mexCD*, Δ*mexEF*, Δ*mexXY*.

D'après les dernières recommandations EUCAST (*European Comittee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) parues en 2024, on estime que les entérobactéries sont sensibles à la ciprofloxacine avec une CMI < 0,25 et résistantes avec une CMI > 0,5 ; les *Pseudomonas spp* sont considérées comme sensibles avec une CMI < 0,1 et résistantes avec une CMI > 0,5. Concernant les tétracyclines, les entérobactéries sont sensibles avec une CMI < 0,5 et résistantes avec une CMI > 0,5 ; tandis que les *Pseudomonas spp* sont naturellement résistantes.
Les faibles CMI de la ciprofloxacine (0,016 µg/ml) et de la doxycycline (1 µg/ml) chez *E. coli* AG100 traduisent une sensibilité intrinsèque de la souche vis-à-vis de ces deux antibiotiques. En effet, les fluoroquinolones et les tétracyclines, auxquelles appartiennent respectivement la ciprofloxacine et la doxycycline, sont des familles d'antibiotiques qui pénètrent facilement chez *E. coli* en empruntant la voie des porines ou en diffusant à travers les lipides des membranes.[14,219] Chez *P. aeruginosa* en revanche, si la CMI de la ciprofloxacine (0,128 µg/ml) est assez faible, celle de la doxycycline (64 µg/ml) est très élevée. En effet, contrairement à la ciprofloxacine qui diffuse à travers les membranes de *P. aeruginosa*,[220] la doxycycline fait partie des antibiotiques vis-à-vis desquels *P. aeruginosa* est naturellement résistante.[215,216]

Chez les mutants dépourvus d'efflux, les valeurs de CMI sont divisées par 4 pour les deux antibiotiques chez AG100A comparé à AG100, et divisées par 16 pour la ciprofloxacine et par 64 pour la doxycycline chez PA403 comparé à PAO1. Ces résultats confirment que les deux antibiotiques sont des substrats des pompes d'efflux et attestent du rôle majeur de l'efflux dans la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. L'emploi de molécules inhibitrices de l'efflux pour augmenter l'activité antibactérienne d'antibiotiques est de ce fait naturellement justifié.

La molécule NV716 potentialise les activités antibactériennes de la ciprofloxacine et de la doxycycline et augmente la sensibilité de AG100 et PAO1 vis-à-vis de ces antibiotiques. En effet, la présence de NV716 induit une diminution des CMI de la ciprofloxacine d'un facteur 2 chez les deux souches, tandis que les CMI de la doxycycline diminuent d'un facteur 8 et 64 chez *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement. Comme rapporté auparavant, NV716 crée chez *P. aeruginosa* une sensibilité nouvelle à la doxycycline.

L'effet potentialisateur de NV716 pourrait s'expliquer soit par l'inhibition de l'efflux des antibiotiques, soit par la perturbation de l'intégrité membranaire. Dans les deux cas, NV716 devrait permettre aux antibiotiques de s'accumuler davantage dans les bactéries.

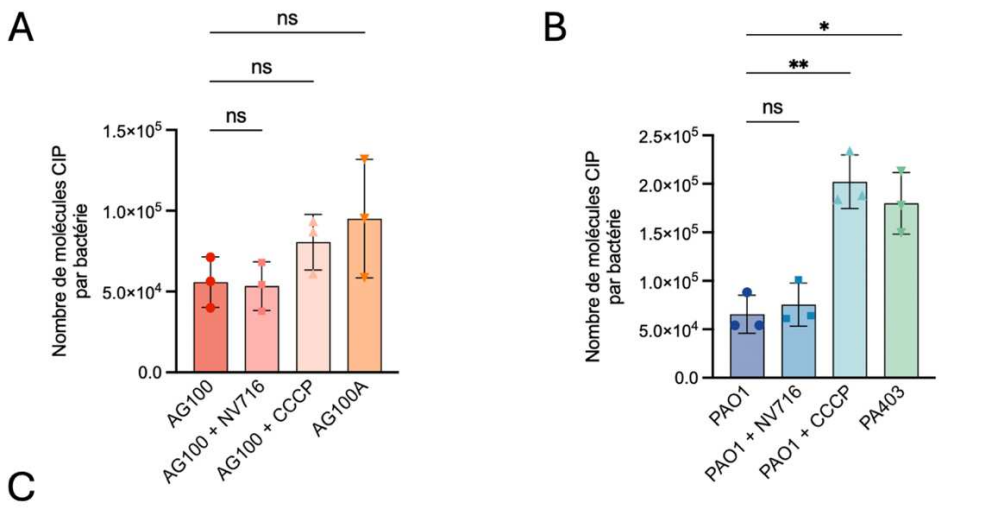
II) Accumulation d'antibiotiques par spectrofluorimétrie sur population totale

1. Mesure de l'accumulation de la ciprofloxacine

La mesure par spectrofluorimétrie de l'accumulation des fluoroquinolones chez les entérobactéries, a été développée et validée depuis plusieurs années au sein de l'unité MCT.[221] Cette technique repose sur la quantification des molécules antibiotiques dans des lysats bactériens, rendue possible grâce aux propriétés de fluorescence intrinsèques des fluoroquinolones. Après traitement des données, les résultats sont présentés en nombre de molécules d'antibiotique par bactérie.[221]

L'accumulation de la ciprofloxacine a été mesurée chez *E. coli* (Fig. 17A) et *P. aeruginosa* (Fig. 17B) après 15 minutes d'exposition des bactéries avec l'antibiotique. L'impact de l'efflux sur l'accumulation de la ciprofloxacine a été étudié en comparant les souches sauvages AG100 et PAO1, aux souches mutantes sans efflux AG100A et PA403. Également, le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), un protonophore connu comme agent découplant de la force proton-motrice nécessaire au fonctionnement des pompes d'efflux, a été utilisé ici comme inhibiteur contrôle de l'efflux.

Afin de caractériser les différences d'accumulation entre les conditions testées, l'index d'efflux SICAR (*Structure Intracellular Concentration Activity Relationship*) a été calculé. Il s'agit du ratio entre les valeurs moyennes du nombre de molécules d'antibiotiques accumulées dans une souche sans efflux par rapport à celui dans la souche sauvage. Plus la valeur du SICAR est grande, plus la différence entre les deux conditions est marquée et plus l'effet d'une molécule testée est important.



C

SICAR					
AG100 + NV716	AG100 + CCCP	AG100A	PAO1 + NV716	PAO1 + CCCP	PA403
0.96	1.45	1.57	1.15	3.09	2.75

Figure 17 : Accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine (CIP) chez *E. coli* (A) et *P. aeruginosa* (B) exprimée en nombre de molécules antibiotiques par bactérie. La fluorescence de la ciprofloxacine est mesurée dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie après 15 minutes d'incubation. CIP : 5 µM ; CCCP, NV716 : 10 µM. (C) Valeurs de SICAR de chaque condition mesurées par rapport à la condition contrôle.

L'efflux joue un rôle plus important sur l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine chez *P. aeruginosa* que chez *E. coli*. En effet, la valeur de SICAR de PA403 est de 2,75 tandis que celle de AG100A est de 1,57 (Fig. 17C). Chez les deux souches, en présence de CCCP l'accumulation de la ciprofloxacine est équivalente à celle du mutant sans efflux, confirmant l'utilisation de CCCP comme inhibiteur de pompes d'efflux.
La présence de NV716 n'a en revanche aucun effet sur l'accumulation de la ciprofloxacine chez les deux souches. Les valeurs de SICAR sont en effet proches de 1, ce qui sous-entends que NV716 n'est pas un inhibiteur de pompes d'efflux. L'effet potentialisateur de NV716 observé lors des tests de sensibilité à la ciprofloxacine (Tab. 2) ne semble pas assez important pour que l'on puisse mesurer une différence au niveau de l'accumulation de l'antibiotique en absence et en présence de NV716.

2. Mesure de l'accumulation de la doxycycline

a. Quantification dans des lysats bactériens

Les tétracyclines possédant également des propriétés de fluorescence intrinsèques, la même méthode de quantification a été appliquée pour mesurer l'accumulation de la doxycycline. Une mise au point du protocole a cependant été nécessaire en raison de problèmes liés à la fluorescence de l'antibiotique.
En effet, la lyse chimique des bactéries a dû être remplacée par une technique de lyse thermique par cycles de congélation-décongélation à cause de l'extinction de la fluorescence de la doxycycline lors de l'utilisation d'un tampon de lyse à pH acide. Également, le pic de fluorescence de la doxycycline (520 nm) étant altéré par celui de la pyoverdine (460 nm), un sidérophore chromophore synthétisé par *P. aeruginosa*,[222] les expériences d'accumulation de la doxycycline ont dû être réalisées dans une souche mutante dérivée de PAO1. Cette souche nommée PAS263, est délétée du gène *pvdF* qui code la pyoverdine.

Chez *E. coli*, l'absence d'efflux ne semble étrangement pas affecter l'accumulation de la doxycycline. Que ce soit chez le mutant AG100A ou en présence de CCCP, aucune différence d'accumulation avec la souche sauvage AG100 n'est constatée. De façon encore plus surprenante, NV716 induit une diminution de l'accumulation de la doxycycline (Fig. 18A). Afin d'interpréter ces résultats, l'effet de la polymyxine B (PMB) a été testé. Cet antibiotique connu pour perméabiliser les membranes, affiche un résultat similaire en diminuant l'accumulation de la doxycycline, laissant supposer que comme la polymyxine B, NV716 agit sur perméabilité membranaire.
Il est probable que la diminution observée soit due à une fragilisation des membranes par la PMB et NV716, qui, accentuée par les étapes de centrifugation, conduise à la lyse des bactéries.

Chez *P. aeruginosa*, le manque de reproductibilité des résultats ne permet pas de les interpréter (Fig. 18B). L'efficacité de la lyse thermique n'est probablement pas optimale chez *P. aeruginosa* étant donnée la composition de sa paroi.

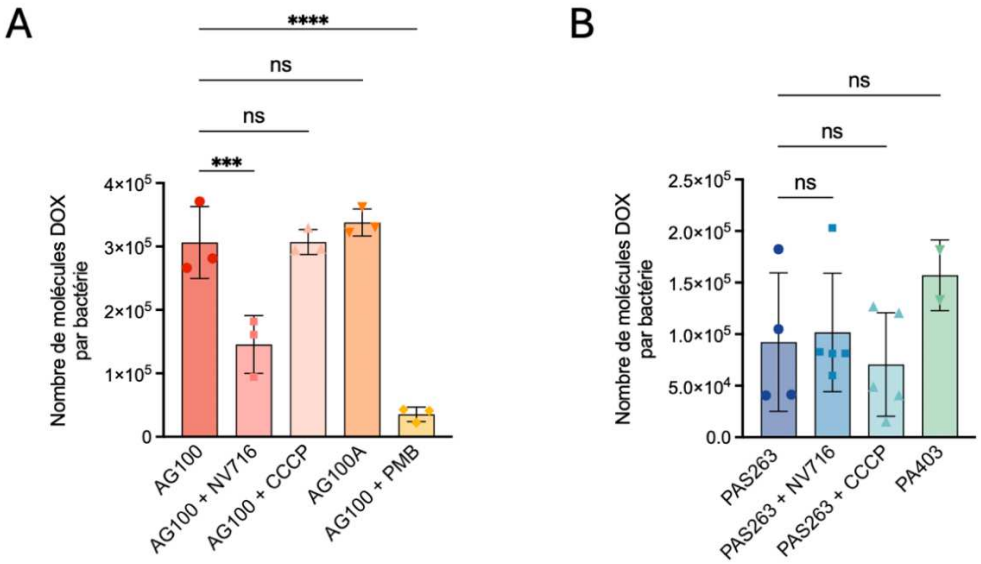


Figure 18 : Accumulation intracellulaire de la doxycycline (DOX) chez *E. coli* (A) et *P. aeruginosa* (B) exprimée en nombre de molécules antibiotiques par bactérie. La fluorescence de la ciprofloxacine est mesurée dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie après 15 minutes d'incubation. DOX, CCCP, NV716 : 10 µM.

De manière intéressante, il a été remarqué après la lyse des bactéries, une forte intensité de fluorescence de la doxycycline dans le culot de débris cellulaires. En effet, la centrifugation des échantillons après la lyse bactérienne permet normalement de récupérer dans le surnageant « clarifié » les molécules antibiotiques accumulées à l'intérieur des bactéries. Or la doxycycline se retrouve dans le culot, ce qui ne permet pas une analyse correcte de son accumulation.
Si cette technique est bien adaptée aux fluoroquinolones, ce n'est pas le cas pour la doxycycline. Il a donc fallu trouver une méthode alternative pour mesurer son accumulation.

La doxycycline est un antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines en se fixant aux ribosomes. Étant donné le poids moléculaire élevé des ribosomes, il est probable qu'ils se retrouvent dans le culot après la lyse et la centrifugation, entraînant avec eux les molécules de doxycycline fixées.

Afin de déterminer si la forte intensité de fluorescence de la doxycycline associée aux ribosomes pourrait être utilisée pour mesurer son accumulation dans les bactéries, la fluorescence de la doxycycline a été mesurée en présence de ribosomes purifiés.[223] Comme le montre la figure 19, l'intensité de fluorescence de l'antibiotique augmente en présence de quantités croissantes de ribosomes, jusqu'à atteindre une saturation de l'interaction. Cette propriété est en effet commune aux tétracyclines et implique la présence d'ions Mg^{2+}, nécessaires à la fixation des tétracyclines aux ribosomes et responsables de l'augmentation de leur fluorescence.[224]

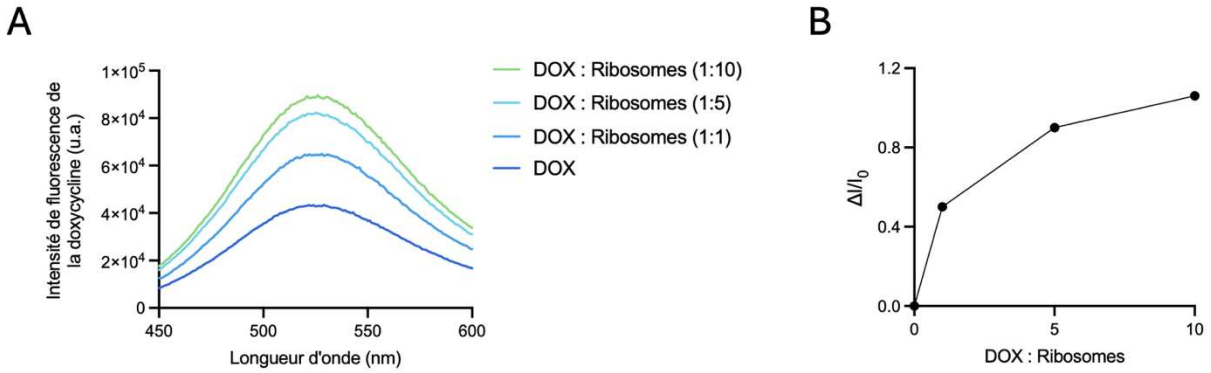


Figure 19 : Interaction de la doxycycline avec des ribosomes purifiés. (A) Augmentation du pic de fluorescence de la doxycycline avec la concentration en ribosomes. (B) Rapport des différences d'intensités de fluorescence de la doxycycline en présence ou en absence de ribosomes (ΔI) sur l'intensité de fluorescence de la doxycycline seule (I_0) en fonction des rapports de concentration entre la doxycycline et les ribosomes (DOX : Ribosomes).

La fluorescence de la doxycycline augmentant lorsqu'elle se fixe à sa cible intracellulaire, cette propriété a été mise à profit afin de suivre l'accumulation de la doxycycline dans les bactéries intactes. L'utilisation de cette méthode a été rapportée dans plusieurs études.[187,225,226]

b. Suivi au cours du temps dans des bactéries intactes

L'accumulation de la doxycycline a été suivie sur 30 minutes par spectrofluorimétrie. Chez *P. aeruginosa*, la présence de NV716 entraîne une augmentation importante et rapide de l'accumulation de doxycycline dans la souche PAS263 (Fig. 20A) comme dans le mutant PA403 dépourvu d'efflux (Fig. 20B). Après 30 minutes en présence de NV716, l'accumulation de la doxycycline a été multipliée d'un facteur ~ 4,5 dans les deux souches. Ces résultats confirment que le mode d'action de NV716 est indépendant de l'efflux. De plus, l'effet de la polymyxine B sur l'accumulation de la doxycycline est comparable à celui de NV716, suggérant un mécanisme d'action similaire entre les deux molécules. Par ailleurs, la diminution de l'accumulation observée après 10 minutes en présence de PMB est probablement due à la lyse des bactéries. En effet, contrairement à NV716 qui n'a pas d'activité antibactérienne, la PMB est un antibiotique connu pour perturber les membranes des bactéries à Gram-négatif, induisant une rupture de l'intégrité physique des cellules.
Si NV716 à un effet indéniable sur l'accumulation de la doxycycline chez *P. aeruginosa*, il ne semble en revanche avoir aucun impact sur l'accumulation de doxycycline chez *E. coli* (Fig. 20C).

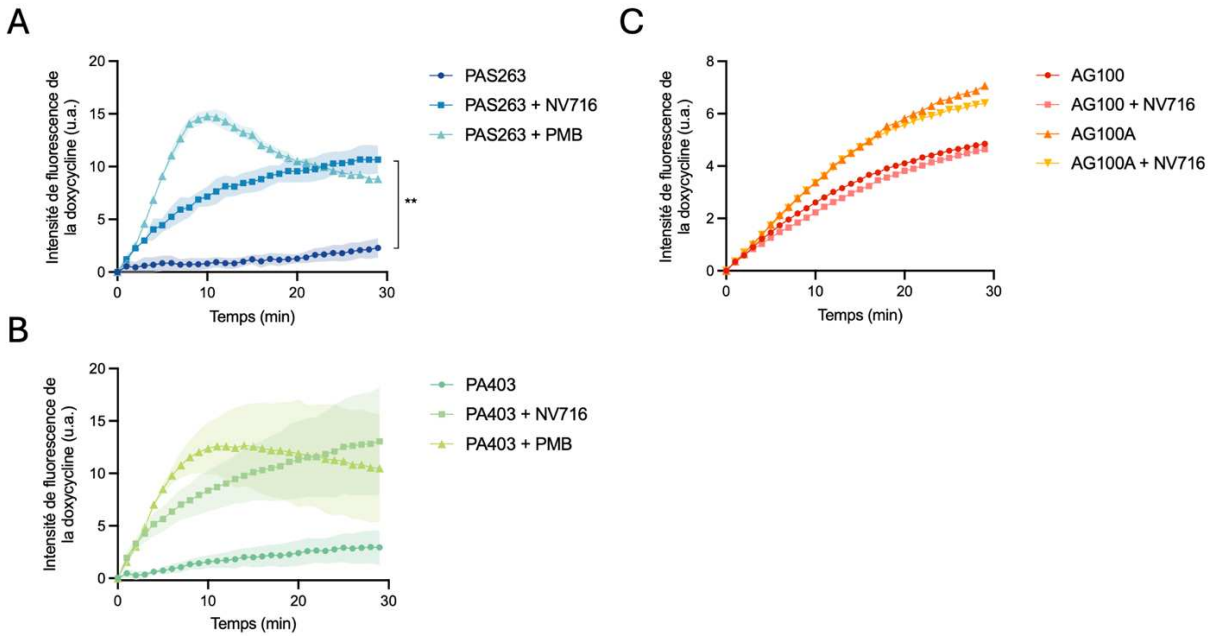


Figure 20 : Suivi au cours du temps de l'accumulation intracellulaire de la doxycycline chez *P. aeruginosa* PAS263 (A), PA403 (B), et chez *E. coli* (C) par spectrofluorimétrie. (A-B) DOX : 100 µM ; NV716, PMB : 10 µM. (C) DOX : 25 µM ; NV716 : 2,5 µM.

Les tétracyclines traversent la membrane externe d'*E. coli* en empruntant le canal des porines majoritaires OmpF et OmpC.[219] Ainsi, une molécule perméabilisant la membrane externe telle que NV716, n'aurait peu voire pas d'effet sur l'accumulation de l'antibiotique chez *E. coli*, à la différence de *P. aeruginosa* qui ne possède pas de telles porines. Afin de confirmer le rôle de ces porines, l'accumulation de la doxycycline a été mesurée dans des mutants dérivés de AG100 et AG100A délétés des gènes *ompF et ompC* (AG100ΔFC ; AG100AΔFC). Comme supposé, l'absence de porines met en évidence l'effet de NV716 sur la perméabilité membranaire puisqu'une augmentation de l'accumulation de la doxycycline est observée en présence de NV716 chez les deux souches (Fig. 21). Cependant, cette différence due à la présence de NV716 n'est valable que durant les 15 premières minutes du suivi d'accumulation. NV716 permettrait donc à la doxycycline de s'accumuler plus rapidement chez *E. coli*, un effet non observé car négligeable en présence des porines.

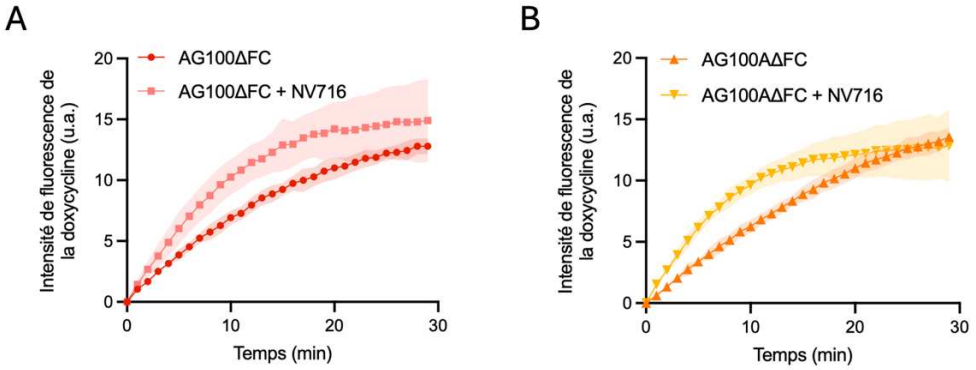


Figure 21 : Suivi au cours du temps de l'accumulation intracellulaire de la doxycycline chez *E. coli* AG100ΔFC (A) et AG100AΔFC (B) par spectrofluorimétrie. DOX : 50 µM ; NV716 : 5 µM.

Suite à ces observations, les cinétiques d'accumulation de la doxycycline ont été mesurées en faisant varier la concentration extracellulaire de l'antibiotique. Pour chacune des concentrations testées, la vitesse initiale d'accumulation correspond à la pente de la tangente à la courbe *RFU = f(t)*.

En absence de NV716, les vitesses d'accumulation de la doxycycline dans les souches PAS263 et PA403 sont très faibles et n'augmentent quasiment pas avec la concentration extracellulaire de l'antibiotique. A l'inverse, en présence de NV716, plus la concentration extérieure en doxycycline est grande, plus l'accumulation est rapide (Fig. 22A). À la plus forte concentration testée (100 µM), la doxycycline s'accumule environ 12,5 fois plus vite en présence de NV716 chez les deux souches de *P. aeruginosa* avec et sans efflux.
Le même phénomène est observé chez les souches d'*E. coli* n'exprimant pas les porines OmpF et OmpC (Fig. 22B). La vitesse d'accumulation de la doxycycline augmente avec la concentration chez les deux souches en présence de NV716, mais dans une moindre mesure, également en absence de NV716. La différence de vitesse en absence et en présence de NV716 est par conséquent beaucoup moins marquée. À 100 µM, la vitesse d'accumulation de la doxycycline n'est multipliée que d'un facteur ~ 2,5. Ces résultats sont cohérents avec ceux du suivi d'accumulation présentés en figure 13. En effet, la perméabilité membranaire intrinsèque élevée de *E. coli* limite l'impact de NV716 sur l'accumulation de la doxycycline. Au contraire chez *P. aeruginosa*, la faible perméabilité membranaire se prête à l'étude de l'impact d'une molécule perméabilisante telle que NV716. Par ailleurs, en absence de NV716 la doxycycline s'accumule environ 7 fois plus vite chez *E. coli* que chez *P. aeruginosa,* reflétant cette différence de perméabilité vis-à-vis de la doxycycline.

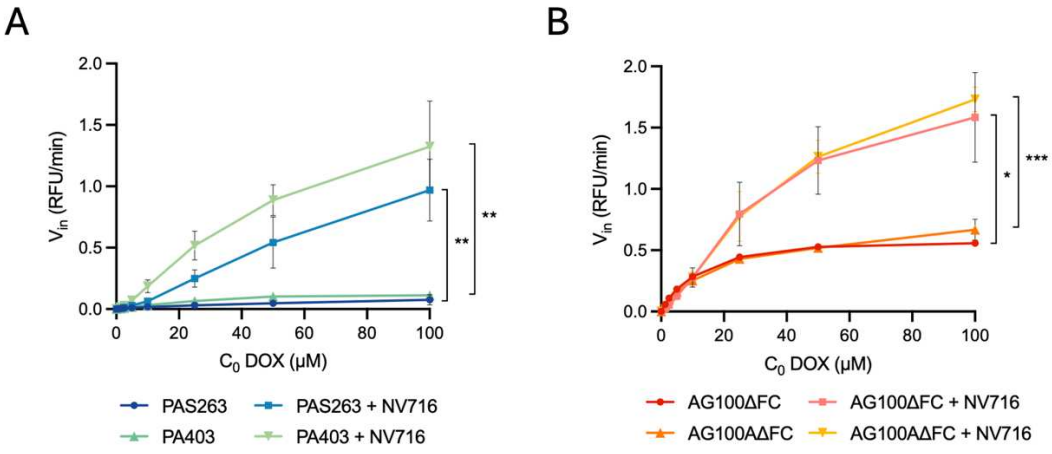


Figure 22 : Vitesses initiales d'accumulation de la doxycycline chez *P. aeruginosa* (A) et *E. coli* (B) en fonction de la concentration C_0 extracellulaire de la doxycycline.

Ces expériences ont permis d'estimer le gain de perméabilité membranaire de la doxycycline en présence de NV716. Les calculs ont été réalisés à partir d'un modèle de diffusion simple en s'affranchissant du mécanisme d'efflux (voir Matériels et Méthodes). Les résultats de perméabilité *P* estimés en µm/min sont présentés dans le tableau 3.
En accord avec les vitesses d'accumulation mesurées précédemment, la perméabilité membranaire de la doxycycline est environ 4 fois plus faible chez PA403 ($4{,}45.10^{-4}$ µm/min) comparé à AG100A ($1{,}82.10^{-3}$ µm/min).

La présence de NV716 augmente la perméabilité de PA403 d'un facteur 3,33, permettant à PA403 d'atteindre une valeur de perméabilité comparable à celle de AG100A en absence de NV716.
Ces valeurs illustrent bien la différence de perméabilité entre les deux espèces bactériennes, et confirment de nouveau l'effet de NV716 sur la perméabilité membranaire et sur l'accumulation de la doxycycline.

A

	P (µm/min)
PA403	$4{,}45.10^{-4}$
PA403 + NV716	$1{,}48.10^{-3}$
Gain	**3,33**

B

	P (µm/min)
AG100A	$1{,}82.10^{-3}$
AG100AΔFC	$2{,}05.10^{-3}$
AG100AΔFC + NV716	$2{,}46.10^{-3}$
Gain	**1,20**

Tableau 3 : Estimation du gain de perméabilité membranaire de la doxycycline chez les souches dépourvues d'efflux PA403 (A) et AG100AΔFC (B) en présence de NV716. P : perméabilité.

III) Accumulation d'antibiotiques par microscopie à fluorescence UV sur bactéries uniques

Les propriétés de fluorescence intrinsèque de la ciprofloxacine et de la doxycycline permettent d'étudier leur accumulation dans les bactéries selon deux approches complémentaires de fluorimétrie. La première approche, dont les résultats viennent d'être présentés, permet de mesurer l'accumulation des antibiotiques dans une population totale par spectrofluorimétrie. La seconde approche permet de mesurer au cours du temps l'accumulation des antibiotiques dans des bactéries isolées par microscopie à fluorescence UV.
Cette seconde approche a été développée sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL.[221] Elle est référée ci-après comme « méthode classique » en comparaison à une méthode optimisée via l'utilisation d'un dispositif de microfluidique.

Les « temps de faisceau » mentionnés dans cette partie correspondent à du temps alloué sur une ligne de lumière d'un synchrotron suite à un dépôt de projet.

1. Méthode classique

a. Accumulation de la ciprofloxacine

Similairement aux expériences de spectrofluorimétrie, l'accumulation de la ciprofloxacine a été étudiée par microscopie à fluorescence UV chez *E. coli* et *P. aeruginosa*. Pour chacune des conditions testées, les images de microscopie obtenues ont été traitées (voir Matériels et Méthodes) et les résultats ont été représentés sous la forme de graphiques (Fig. 23). Chaque courbe correspond à la fluorescence moyenne mesurée chez plusieurs bactéries isolées. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine.

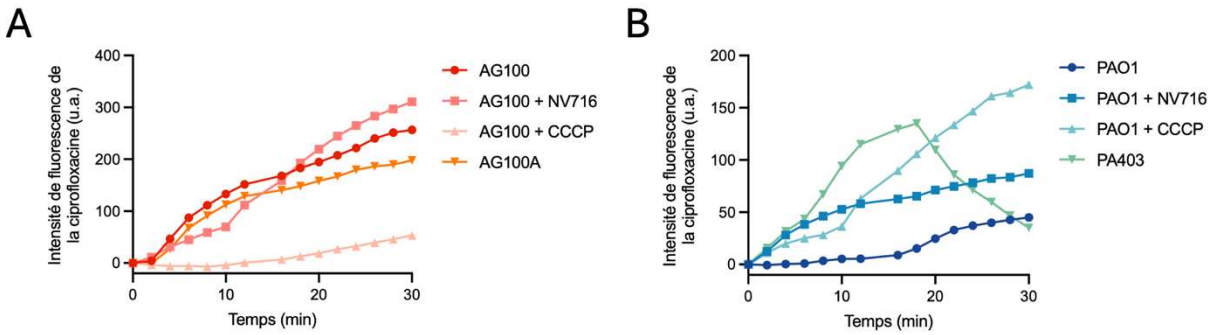


Figure 23 : Suivi au cours du temps de l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine chez *E. coli* (A) et *P. aeruginosa* (B) par microscopie à fluorescence UV. Chaque courbe est une moyenne de la fluorescence mesurée dans des bactéries isolées. CIP : 5 µM ; CCCP, NV716 : 10 µM.

Chez *E. coli*, l'intensité de fluorescence augmente au cours du temps pour chacune des conditions testées, traduisant une accumulation de l'antibiotique dans les bactéries. Cependant, la fluorescence mesurée chez AG100 en présence de CCCP et chez le mutant AG100A dépourvu d'efflux, est plus faible que chez AG100 (Fig. 23A). Ce résultat s'explique par la cinétique d'accumulation rapide de la ciprofloxacine qui, associée à un temps trop long de préparation de l'échantillon, empêche de collecter la fluorescence des premiers temps d'accumulation. En effet, cette méthode implique de mettre l'antibiotique au contact des bactéries, de déposer une goutte de la suspension entre 2 lamelles, puis une fois sous le microscope, de trouver une zone propice au suivi des bactéries au cours du temps, soit une zone où les bactéries sont immobiles. Le temps écoulé entre le moment où les bactéries sont au contact de l'antibiotique et le début de la cinétique d'accumulation est de quelques minutes qui suffisent à créer un biais dans la mesure.
Chez *P. aeruginosa*, les résultats semblent plus rationnels (Fig. 23B). Notamment, la présence de CCCP induit une plus forte augmentation de l'intensité de fluorescence, et donc de l'accumulation de la ciprofloxacine, comparé à PAO1 seul, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en spectrofluorimétrie (voir Fig. 17B). À la différence d'*E. coli*, les premiers temps d'accumulation perdus lors de la préparation de l'échantillon semblent très peu affecter la mesure. Ce constat pourrait être attribué à une cinétique d'accumulation plus lente de la ciprofloxacine chez *P. aeruginosa*. Chez le mutant d'efflux PA403, l'intensité de fluorescence augmente également, mais diminue soudainement au bout de 15-20 minutes, probablement en raison de la lyse des bactéries.

L'analyse de ces résultats nécessite toutefois de souligner la différence majeure entre la mesure par spectrofluorimétrie et celle de microscopie. En effet, en spectrofluorimétrie l'accumulation de l'antibiotique est observée dans une population contenant des centaines de milliers de bactéries, tandis qu'elle se limite à quelques dizaines en microscopie. Ce nombre réduit de bactéries met en avant les différences phénotypiques au sein d'une population, qui se traduisent par des différences de niveau d'accumulation d'une bactérie à une autre. Ainsi, les expériences de microscopie doivent être reproduites un grand nombre de fois afin d'être représentatives d'une population.

2. Mise au point d'un dispositif de microfluidique

Dans l'objectif d'optimiser la technique de suivi de l'accumulation en microscopie, un dispositif de microfluidique a été mis au point. Ce dispositif doit permettre de s'affranchir des deux principales limitations de la méthode « classique », à savoir la mobilité des bactéries avant et pendant l'acquisition, et l'impossibilité d'enregistrer les premiers temps d'accumulation.
Premièrement, concernant la mobilité des bactéries, il s'agit d'un problème faisant perdre un temps précieux lors des temps de faisceau limités. En effet, il faut trouver rapidement une zone (ROI ; *Region Of Interest*) où les bactéries soient immobiles, ce qui contraint parfois à recommencer la préparation de l'échantillon. De plus, les bactéries peuvent bouger pendant l'acquisition et sortir du champ de vue du microscope. Cette perte de temps limite le nombre de conditions étudiées ainsi que le nombre de répétions d'une condition, élément pourtant très important en microscopie pour obtenir des résultats représentatifs d'une population, comme discuté précédemment.
Deuxièmement, les premiers temps d'accumulation ne pouvant être enregistrés, dans le cas d'une accumulation rapide cela ne permet pas une analyse comparative des résultats pour différentes conditions.

La puce microfluidique, composée de deux entrées et d'une sortie, a été conçue au laboratoire de microfluidique du synchrotron SOLEIL. Les deux branches d'entrée, dans lesquelles sont injectées la solution tampon dans l'une et l'antibiotique dans l'autre, se rejoignent au niveau du canal principal au bout duquel se trouve la sortie (Fig. 24). La présence de deux canaux d'entrée permet de procéder à des changements rapides entre les deux solutions sans les mélanger.
La puce est fixée sur une lamelle de quartz recouverte de poly-L-lysine (PLL), permettant d'immobiliser les bactéries sur le fond du canal.[227] L'absence de toxicité vis-à-vis des bactéries ainsi que l'absence de fluorescence UV de la PLL ont été vérifiées en amont.
L'acquisition récente sur la ligne de lumière DISCO d'un contrôleur de pression, couplé à un logiciel d'acquisition installé sur le microscope plein champ « Telemos », a permis de contrôler à distance et avec précision, l'injection de la solution d'antibiotique dans la puce. De cette façon, le temps t_0 de l'accumulation de l'antibiotique dans les bactéries a pu être enregistré.

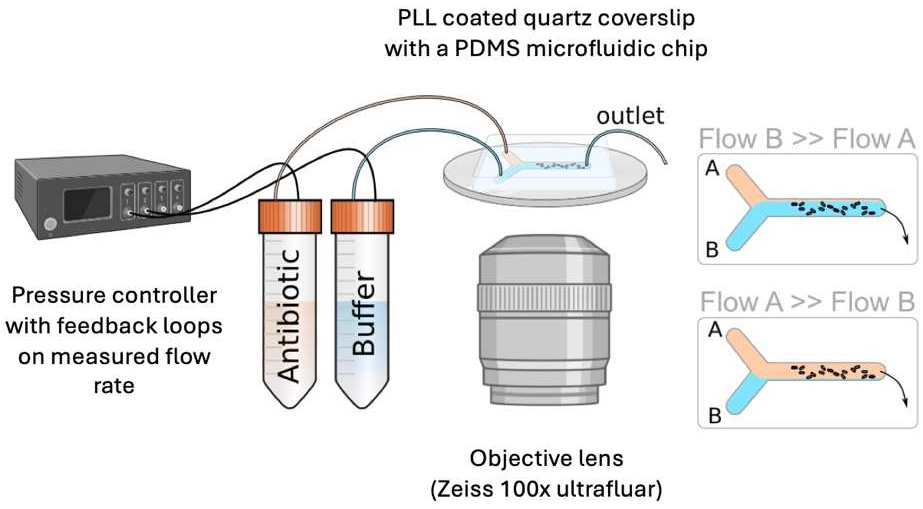


Figure 24 : Représentation schématique du dispositif de microfluidique.

Les premiers tests d'accumulation avec le système de microfluidique ont été effectués avec la ciprofloxacine chez la souche AG100 d'*E. coli*. La ciprofloxacine a été injectée 2 minutes après le début de l'acquisition qui a duré au total 30 minutes. Le panneau supérieur montre les bactéries en lumière visible, le panneau inférieur en fluorescence UV (Fig. 25).

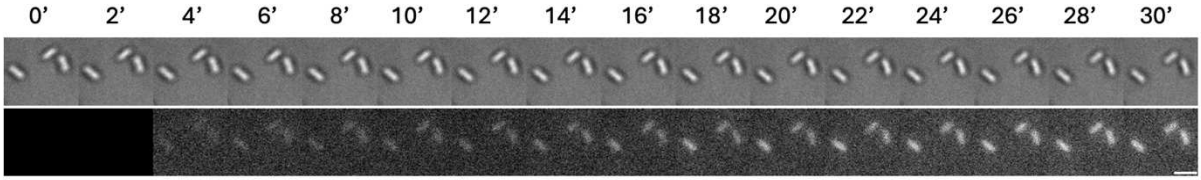


Figure 25 : Accumulation au cours du temps de la ciprofloxacine dans des bactéries isolées AG100 sous microscope à fluorescence UV. Panel du haut : lumière visible ; panel du bas : fluorescence UV. λ_{ex} = 275 nm ; filtre d'émission : 420-480 nm. Les minutes sont indiquées au-dessus de la figure. CIP : 5 µM. Échelle = 3 µm.

L'utilisation de ce système pour suivre l'accumulation de la ciprofloxacine au cours du temps a été validé. En effet, comme le montre les images acquises en lumière visible, les bactéries ne bougent pas durant toute la durée de l'expérience (Fig. 25, panneau supérieur). Également, le début de l'accumulation de l'antibiotique dans les bactéries a pu être enregistré et une augmentation progressive de la fluorescence au cours du temps a pu être observée (Fig. 25, panneau inférieur).
En raison de problèmes liés à un manque d'étanchéité au niveau des puces pendant l'acquisition, seule la condition AG100 en présence de ciprofloxacine a pu être testée pendant ce temps de faisceau. L'accumulation en présence de CCCP et dans le mutant d'efflux AG100A n'ont pas été testées, et en l'absence d'une condition contrôle AG100 sans antibiotique, les images n'ont pas pu être traitées et représentées sous forme graphique.

Le dispositif de microfluidique a de nouveau été testé lors d'un second temps de faisceau consacré cette fois-ci à l'accumulation de la doxycycline chez *P. aeruginosa*. Cependant, des ajustements préliminaires au niveau du dispositif ont été nécessaires.
D'une part, afin d'éviter la survenue de fuites pendant l'acquisition, le diamètre des trous formés au niveau des entrées et sortie de la puce ont été réduits. D'autre part, des tests d'immobilisation des bactéries ont montré que la PLL ne permettait pas d'immobiliser *P. aeruginosa*. Plusieurs alternatives à la PPL ont été testées, dont l'APTES (3-aminopropyltriethoxysilane)[227] qui s'est avéré avoir la meilleure efficacité pour fixer les bactéries.

Comme précédemment, l'antibiotique a été injecté 2 minutes après le début de l'acquisition, et son accumulation a été suivie sur une durée totale de 30 minutes. L'optimisation du système de microfluidique a permis d'obtenir une quantité de données suffisante pour les conditions d'accumulation de la doxycycline en absence et en présence de NV716 chez la souche PAS263 de *P. aeruginosa*. La représentation graphique des résultats obtenus atteste bien du rôle de NV716 dans l'augmentation de l'accumulation de la doxycycline dans les bactéries (Fig. 26A). Cependant, des différences avec les résultats obtenus en spectrofluorimétrie pour ces mêmes conditions (voir Fig. 20A), peuvent être relevées.

Premièrement, un plateau est atteint au bout de seulement 10 minutes en microscopie, tandis qu'il ne semble pas y en avoir un avant 30 minutes en spectrofluorimétrie. Deuxièmement, les résultats de microscopie montrent une augmentation de l'accumulation de la doxycycline d'un facteur ~ 2,5 en présence de NV716 contre ~ 4,5 en spectrofluorimétrie. Et troisièmement, les cinétiques d'accumulation mesurées indiquent que l'accumulation de la doxycycline en présence de NV716 est 8 fois plus rapide en microscopie contre 10 fois en spectrofluorimétrie par rapport à l'accumulation sans NV716. Ces différences plus ou moins importantes entre les deux méthodes s'expliquent probablement par le nombre de bactéries sur lequel sont faites les expériences. L'accumulation en microscopie a été mesurée ici sur une centaine de bactéries seulement, alors que la spectrofluorimétrie se base sur une population entière. Ainsi, en spectrofluorimétrie la variabilité phénotypique de la population est moyennée, incluant sans distinction les bactéries qui accumulent et celles qui n'accumulent pas l'antibiotique. Un avantage de la technique de microscopie mise en œuvre sur la ligne de lumière DISCO permettant d'étudier l'accumulation de l'antibiotique dans chaque bactérie individuellement, est de justement pouvoir considérer ces différences phénotypiques lors de l'analyse des résultats. L'étude de cette variabilité serait certainement intéressante à approfondir, cependant cela nécessite un temps considérable et l'objectif principal de ces expériences était avant tout de comparer l'accumulation de l'antibiotique en présence et en absence de NV716.

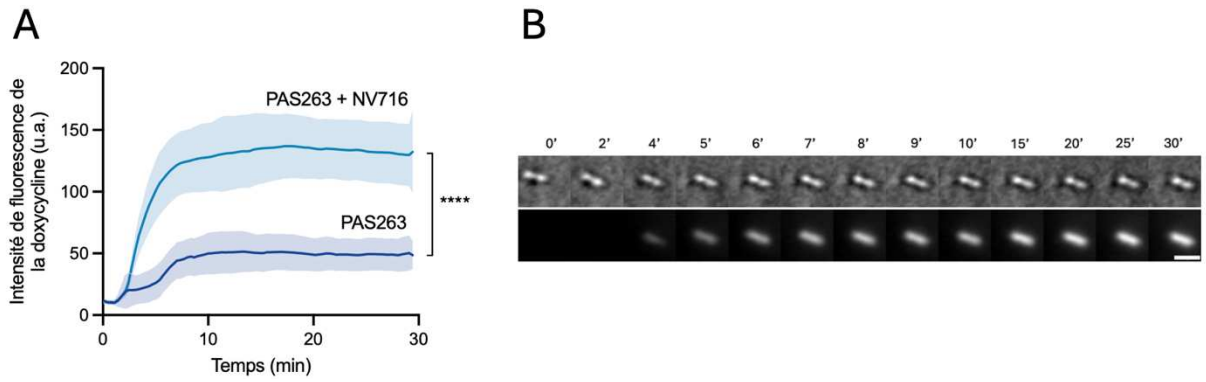


Figure 26 : Suivi au cours du temps de l'accumulation de la doxycycline chez PAS263 en microscopie en fluorescence UV. (A) Chaque courbe est une moyenne de la fluorescence mesurée dans des bactéries isolées (PAS263, n = 65 ; PAS263 + NV716, n = 77). (B) Panel du haut : lumière visible ; panel du bas : fluorescence UV. Filtre d'excitation = 320-380 nm ; filtre d'émission : 480-550 nm. Les minutes sont indiquées au-dessus de la figure. DOX : 100 µM ; NV716 : 10 µM. Échelle = 2 µm.

Un exemple d'une bactérie qui accumule la doxycycline en présence de NV716 au cours du temps est représenté sur la figure 26B. Le plateau apparent sur le graphique (Fig. 26A), est également visible sur les images du panneau inférieur. En effet, la fluorescence de la bactérie augmente les 10 premières minutes puis reste constante.

Le dispositif de microfluidique mis au point permet d'améliorer le suivi d'accumulation d'antibiotiques dans les bactéries en microscopie UV de façon significative. Néanmoins, la technique peut encore être optimisée. De nombreuses acquisitions n'ont pas pu être exploitées du fait de la présence de bulles d'air traversant parfois le canal, et décrochant sur leur passage plusieurs bactéries. De plus, si la PLL convient bien pour la fixation des bactéries *E. coli*, l'APTES est en revanche loin d'être optimal pour immobiliser *P. aeruginosa*.

Le travail initié sur le développement d'un dispositif de microfluidique sera poursuivi dans le cadre d'un projet de master 2 (voir conclusion).

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici excluent un rôle potentiel de NV716 comme inhibiteur d'efflux. Les expériences d'accumulation d'antibiotiques chez des souches dépourvues d'efflux ou de porines, permettent d'avancer que NV716 est une molécule agissant sur la perméabilité membranaire. Par ailleurs, son fort impact sur l'accumulation de la doxycycline chez *P. aeruginosa* suggère que la faible perméabilité de cette espèce vis-à-vis de la doxycycline est, plus que l'efflux, responsable de sa résistance intrinsèque.

IV) Interaction de NV716 avec le LPS

Le mécanisme d'action de NV716 à l'origine de l'augmentation de la perméabilité membranaire chez *P. aeruginosa*, pourrait être due à son interaction avec le LPS localisé à la surface de la membrane externe.

1. Tests de déplacement de la BODIPY-cadavérine

La cadavérine, une molécule naturelle polyaminée, est couplée au fluorophore BODIPY^{TR} pour former la sonde fluorescente BODIPY-cadavérine (BC). Cette sonde, qui se lie de façon spécifique au lipide A du LPS, est utilisée dans un test permettant d'étudier la liaison d'une molécule au LPS.[228] Lorsque la molécule testée se fixe au lipide A, la BC se décroche et sa fluorescence augmente.

La capacité de NV716 à interagir avec le LPS a été testée en mesurant le pourcentage de déplacement de la BC du LPS purifié de *P. aeruginosa* (Fig. 27A) et de *E. coli* (Fig. 27B). Des concentrations croissantes de NV716, de PMB et de chloramphénicol (CHL) ont été testées. Le CHL est un antibiotique qui diffuse à travers les membranes sans se fixer au LPS et sert ici de contrôle négatif. La PMB au contraire, est connue pour perméabiliser la membrane externe suite à sa liaison au LPS. Les résultats montrent que la PMB et NV716 déplacent la BC du LPS de *P. aeruginosa* et de *E. coli*, tandis que le CHL n'a aucun effet (Fig. 27). Cela indique que NV716, comme la PMB, interagit avec le LPS des deux espèces bactériennes. Toutefois, une différence peut être observée entre les deux molécules. Alors que le déplacement de la BC en présence de PMB semble atteindre une limite à partir d'une certaine concentration de PMB, NV716 déplace la BC de façon dose-dépendante. Plus la concentration de NV716 augmente, plus le pourcentage de déplacement est important, laissant supposer que NV716 interagit avec le LPS et y reste accroché. A l'inverse, la liaison de la PMB au LPS n'étant qu'une étape pour franchir la membrane externe, il est possible que le plateau observé corresponde à un équilibre atteint entre les molécules de PMB qui s'accrochent et se décrochent, permettant aux BC déplacées de revenir se fixer aux molécules de LPS.

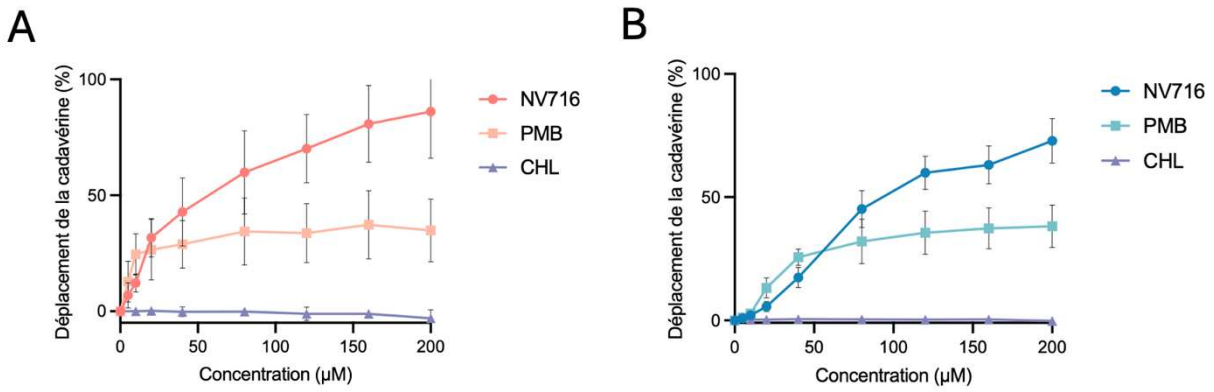


Figure 27 : Tests de déplacement de la BODIPY-Cadavérine du LPS d'*E. coli* (A) et de *P. aeruginosa* (B) en présence de NV716, PMB ou CHL. CHL : Chloramphénicol, témoin négatif.

2. Tests de sensibilité

Afin de renforcer les résultats obtenus avec le test de liaison au LPS, les CMI de la doxycycline combinée au NV716 ont été déterminées chez PAO1 et AG100, en présence de concentrations croissantes de LPS purifié de *P. aeruginosa* (Fig. 28A) et de *E. coli* (Fig. 28B).

L'activité antibactérienne de la combinaison DOX-NV716 chez PAO1 et chez AG100 diminue de façon dose-dépendante en présence des LPS purifiés des deux espèces. Cela indique que NV716 interagit avec le LPS exogène plutôt qu'avec le LPS présent à la surface des bactéries. Toutefois, l'inhibition de l'activité antibactérienne est plus forte en présence de LPS de *P. aeruginosa* qu'en présence de LPS d'*E. coli*, témoignant d'une affinité plus forte de NV716 pour le LPS de *P. aeruginosa*. Également, AG100 semble moins affecté que PAO1 par la présence de LPS exogène. Cette observation est cohérente avec les résultats précédents montrant que l'accumulation de la doxycycline est peu impactée par la présence de NV716 chez *E. coli* étant donné sa perméabilité membranaire intrinsèque déjà relativement élevée.

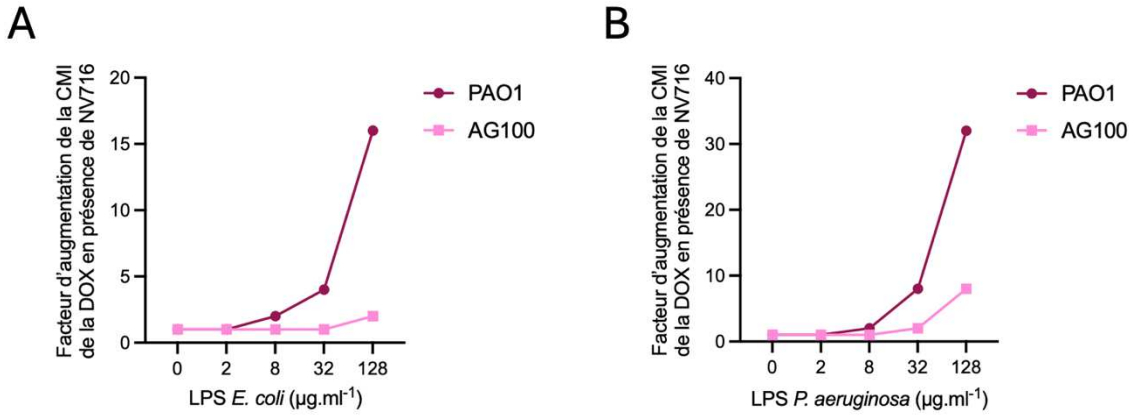


Figure 28 : Tests de sensibilité de PAO1 et AG100 vis-à-vis de la doxycycline combiné à NV716 en présence de différentes concentrations de LPS exogène de *E. coli* (A) ou de *P. aeruginosa* (B). NV716 : 5 µM.

Afin de mieux caractériser l'interaction de NV716 avec le LPS, un second test de sensibilité a été réalisé, cette fois-ci chez des mutants de *P. aeruginosa* possédant des LPS tronqués à différents endroits du noyau oligosaccharidique. Ces troncations sont dues à des mutations dans les gènes de biosynthèse du noyau oligosaccharidique *waaC*, *waaF*, et *waaP*. Les protéines WaaC et WaaF sont des heptosyltransférases qui catalysent l'addition du premier et du deuxième résidu heptose respectivement. WaaP est une enzyme responsable de la phosphorylation du premier résidu heptose.[229] (Fig. 29A)

Les CMI de la doxycycline en absence et en présence de NV716 ont été déterminées pour chacune des souches mutantes. Les facteurs de potentialisation de la doxycycline par NV716 sont plus élevés chez les trois souches mutantes que chez la souche sauvage PAO1 (Fig. 29B). La potentialisation flagrante chez le mutant Δ*waaC* qui ne possède que la partie Kdo_2-lipide A du LPS, laisse supposer que NV716 puisse mieux accéder au lipide A. De façon intéressante, l'absence de phosphorylation sur le premier heptose (Δ*waaP*) permet à NV716 de potentialiser l'activité de la doxycycline au même titre que lorsque le LPS est tronqué après ce même heptose (Δ*waaF*).

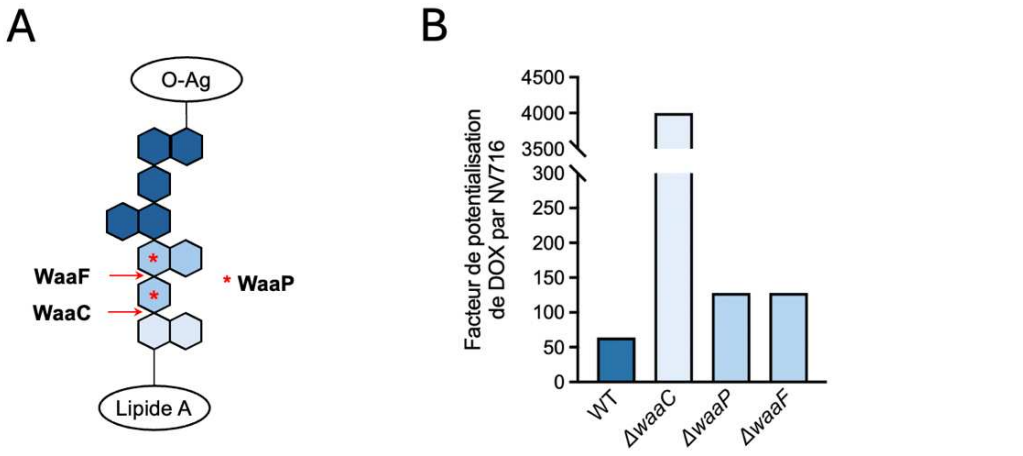


Figure 29 : (A) Représentation schématique du LPS. Bleu clair : résidus Kdo ; bleu moyen : noyau interne oligosaccharidique ; bleu foncé : noyau externe oligosaccharidique. Les activités des enzymes Waa sont représentées par des flèches (WaaF, WaaC) ou par des astérisques (WaaP). Les flèches indiquent l'addition de résidus heptoses. Les astérisques correspondent à des réactions de phosphorylation. (B) Potentialisation de l'activité de la doxycycline par NV716 chez PAO1 et les mutants dérivés Δ*waa*.

NV716 possédant des groupements amines chargés positivement, son interaction avec les groupements phosphates chargés négativement du LPS est tout à fait concevable. Les groupements phosphates du LPS sont situés au niveau des résidus heptose de la partie interne du noyau oligosaccharidique, et au niveau du lipide A. En considérant que NV716 puisse interagir avec ces groupements phosphates sans distinction, ceux présents au niveau des heptoses seraient un frein à l'interaction de NV716 avec ceux du lipide A. Ainsi, dans le cas où ces groupements phosphates seraient absents (souches Δ*waaF ;* Δ*waaP*), NV716 pourrait mieux interagir avec le lipide A et perméabiliser davantage la membrane externe.

L'interaction de NV716 avec les groupements phosphates du LPS implique le déplacement des cations divalents liés aux phosphates, qui participent à la stabilisation de la membrane externe. Allant dans ce sens, la capacité de NV716 à perméabiliser la membrane externe a été antérieurement démontrée comme étant contrebalancée par l'addition d'ions Mg^{2+}.[230] Par ailleurs, lors des expériences d'accumulation, les bactéries

sont resuspendues dans du tampon NaPi contenant du $MgCl_2$. Afin d'évaluer le potentiel rôle du $MgCl_2$, l'accumulation de la doxycycline a été testée de nouveau chez des bactéries resuspendues dans du tampon NaPi sans $MgCl_2$ (Fig. 30). En présence de NV716 ou de PMB l'accumulation de la doxycycline est en effet plus rapide en absence de $MgCl_2$ dans le milieu, indiquant un effet protecteur du $MgCl_2$ vis-à-vis des membranes bactériennes. Si l'absence de cet effet protecteur permet à NV716 d'accélérer l'accumulation de la doxycycline, il rend en revanche les bactéries extrêmement sensibles à la PMB (Fig. 30).

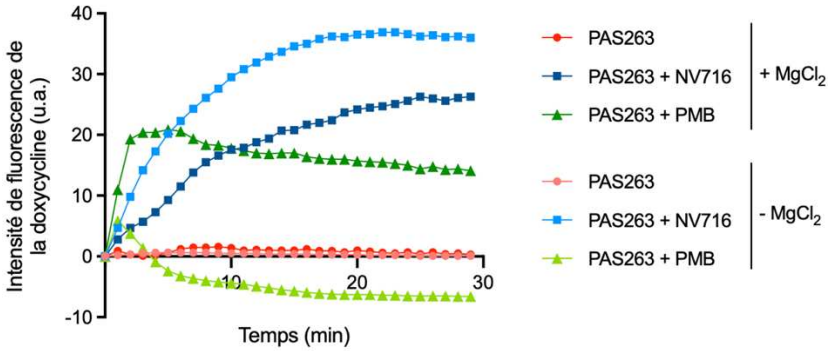


Figure 30 : Suivi au cours du temps de l'accumulation de la doxycycline chez PAS263 en présence ou en absence de $MgCl_2$ par spectrofluorimétrie. DOX : 100 µM ; NV716, PMB : 10 µM.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'augmentation de la perméabilité membranaire en présence de NV716 est due à son interaction avec le lipide A du LPS.

V) Étude de l'activité de NV716 par différentes techniques de microscopie

Plusieurs approches de microscopie ont été mises en œuvre dans l'objectif de caractériser visuellement l'effet de NV716 sur les bactéries. Ces techniques complémentaires apportent chacune des informations en lien avec leur résolution et leurs caractéristiques propres.

1. Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est un moyen simple et rapide pour visualiser un changement au niveau de la morphologie des bactéries. Le FM4-64 est un marqueur de membranes fluorescent utilisé ici pour observer l'effet de NV716 sur la membrane de *P. aeruginosa*.
Les bactéries traitées à la PMB ou au NV716 présentent à leur surface des foyers fluorescents correspondant à des accumulation de matériel membranaire. Les bactéries non traitées (CTL) quant à elles affichent un marquage uniforme de leurs membranes (Fig. 31). L'effet observé sur les membranes en présence de NV716 et de PMB a déjà été rapporté chez *E. coli* après l'exposition des bactéries à des molécules ciblant les machineries d'assemblage des OMP (Bam) ou du transport du LPS (Lpt).[107,231]

Cela indique que l'accumulation de matériel membranaire observé n'est pas spécifique d'une interaction avec le LPS mais résulte plutôt d'une perturbation de la membrane externe.

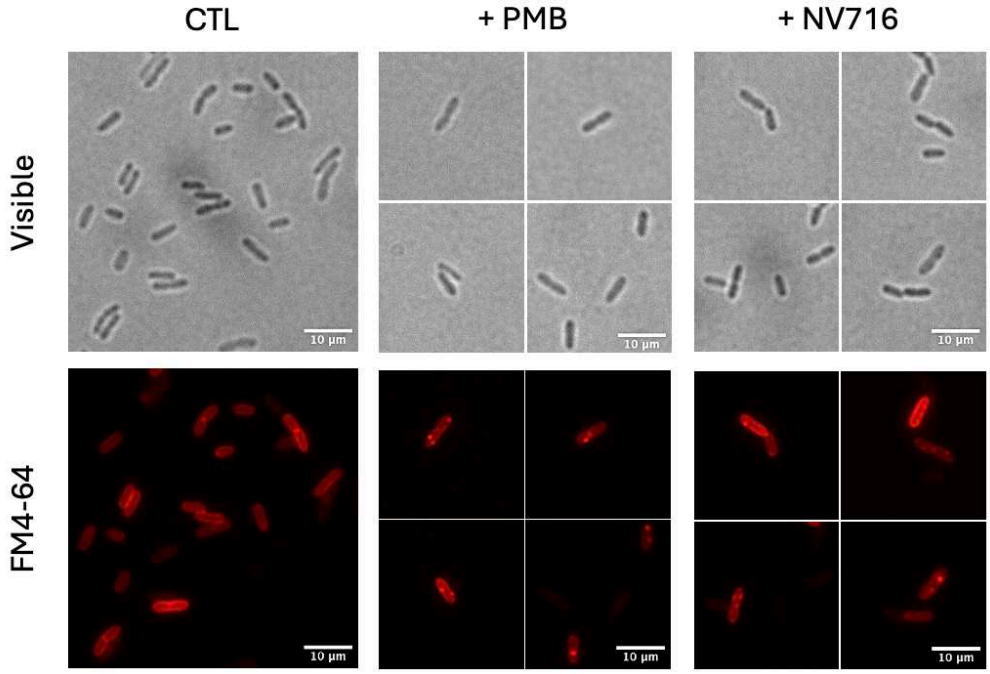


Figure 31 : Observation des bactéries PAO1 en microscopie à fluorescence après marquage des membranes au FM4-64. Filtre d'excitation : 542-582 nm ; filtre d'émission : 603-678 nm. NV716 : 10 µM ; PMB : 1 µM.

L'avantage d'avoir recours à un marquage fluorescent est de pouvoir visualiser un élément, ici la membrane, qu'il est impossible de voir en lumière visible. La microscopie à fluorescence reste toutefois limitée en termes de résolution spatiale, notamment pour l'étude de microorganismes.

2. Microscopie électronique à transmission et EDX

La microscopie électronique est aujourd'hui la technique la plus résolutive, permettant d'obtenir des images à l'échelle du nanomètre. L'utilisation d'un faisceau d'électrons plutôt que de photons, permet d'obtenir une résolution nettement plus élevée en raison de la longueur d'onde des électrons qui est beaucoup plus courte.[232] En microscopie électronique à transmission (MET), l'échantillon nécessite d'être extrêmement fin car les électrons pénètrent faiblement à travers les tissus biologiques. Des coupes minces de l'échantillon d'une dizaine de nanomètres sont donc obligatoirement réalisées, contraignant à l'analyse de matériel non vivant. Les images obtenues sont contrastées selon les niveaux de densité de l'échantillon. Plus une zone est de faible densité, plus elle apparaîtra claire, et inversement, plus la densité est forte plus la zone sera sombre. Ce contraste dépend de la densité de l'échantillon mais aussi de son épaisseur et de sa composition chimique.

Des bactéries de la souche PAO1 de *P. aeruginosa,* traitées ou non par NV716, ont été observées en MET. Bien qu'aucune différence n'ait été observée au niveau des membranes, la présence de granules intracellulaires très denses aux électrons a cependant été constatée chez les bactéries traitées (Fig. 32).

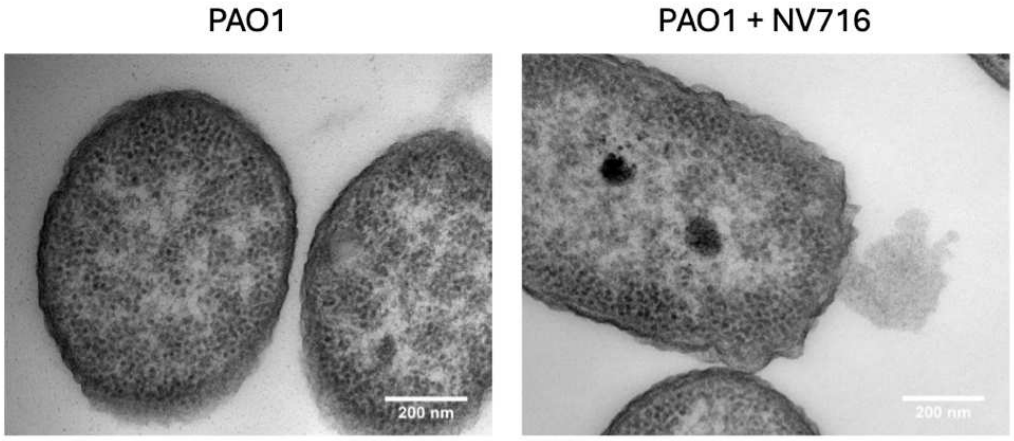
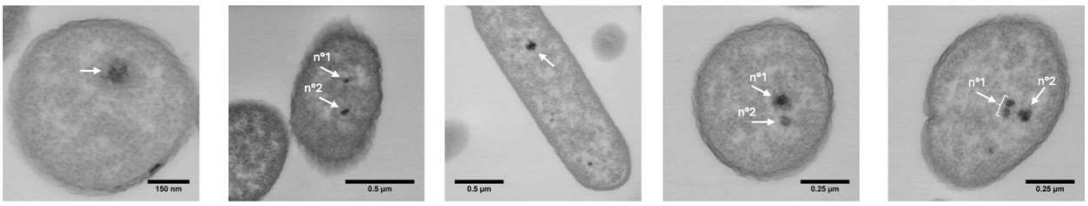


Figure 32 : Observation en microscopie électronique des bactéries PAO1 traitées ou non au NV716 (10 µM).

Afin de déterminer la nature de ces granules, une analyse de leur composition chimique a été menée par spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX ; *Energy Dispersive X-ray spectroscopy*). Cette analyse ne pouvant se faire sur un microscope MET plein champ, les expériences ont été réalisées à l'École Polytechnique sur un microscope électronique à transmission en mode balayage (STEM ; *Scanning Transmission Electron Microscope*) doté d'un détecteur EDX. L'analyse EDX, à la fois qualitative et quantitative, est basée sur l'émission de rayons X suite à l'irradiation de l'échantillon par un faisceau d'électrons. L'énergie des rayons X émis est caractéristique de chaque élément et leur teneur dans l'échantillon peut être quantifiée par l'intensité de ces rayons X.

Les résultats des spectres EDX de zones denses présentes dans des bactéries traitées au NV716 sont résumés dans le tableau de la figure 33. Les valeurs indiquées correspondent à des pourcentages mesurés pour chaque élément dans la zone analysée. Lorsque la valeur d'un élément est absente, cela signifie que l'élément n'a pas été détecté. Une zone du cytoplasme a également été analysée pour chacune des bactéries afin de comparer la composition avec celle des zones denses. Certaines zones denses n'ont pas pu être analysées par EDX en raison de leur taille trop petite.

Plusieurs éléments détectés sont dus à la préparation de l'échantillon. Le carbone et l'oxygène font partie de la résine d'enrobage ; l'uranium et l'osmium sont des constituants des produits utilisés pour la fixation et la coloration de l'échantillon nécessaire pour augmenter le contraste ; tandis que le cuivre et le nickel peuvent en partie provenir des grilles sur lesquelles les coupes de bactéries sont déposées et des éléments constituants le microscope. Seuls le phosphore et le chlore sont des éléments pouvant être attribués de façon spécifique aux bactéries. Les pourcentages de chlore mesurés dans le cytoplasme et les zones denses sont assez comparables. En revanche, le phosphore semble être plus présent dans les zones denses que dans le cytoplasme (Fig. 33).



Élément (%)	Cytoplasme	Zone dense	Cytoplasme	Zones denses		Cytoplasme	Zone dense	Cytoplasme	Zones denses		Cytoplasme	Zones denses	
				n°1	n°2				n°1	n°2		n°1	n°2
C	75,3	53,4	71,9	58	71,3	68,2	61	77	53	69	71,7	65,3	54
O		11,7		10		5,3	5,5	4,3	10,7	6,2	4,8	7,9	10,5
U	6,8	10,8	7,7	9,9	8	10,8	14,7	4,1	9,8	5,5	3,8	8,7	12,4
Os	6,9	7,4	7,5	7,1	6,9	3,9	4,3	7,1	8,2	7,3	7,4	5,1	6,6
P	2	6,1	2,4	5,2	3,3	1,7	3		6,9	4,1	2	4,6	6,5
Cu	2,7	3,6	2,5	2,2	2,4	3,1	3,7	1,8	3,6	2	2,2	2,6	3,5
Cl	4,2	3,1	5	4,1	5,2	4,7	3,4	3,7	3,4	3,3	4,1	3,1	3,2
Ni	2,2	2,8	2,6	3	2,5	2,3	3,3	1,5	2,1	1,6	1,5	1,8	2,1

Figure 33 : Analyse EDX des zones denses observées en microscopie électronique chez les bactéries PAO1 traitées au NV716. Chaque flèche indique une zone dense analysée. Le tableau résume les résultats exprimés en pourcentage d'élément chimique dans chacune des zones denses. Les résultats d'analyse d'une zone du cytoplasme de chacune des bactéries sont également rapportés.

D'après la littérature, ces zones denses composées de phosphore pourraient être des granules de polyphosphates (PolyP). Les PolyP sont des polymères de phosphates inorganiques dont la longueur peut atteindre des dizaines voire des centaines de protomères. Présents aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes, les PolyP possèdent de nombreuses fonctions biologiques.[233] Chez les bactéries, la formation de granules de PolyP survient à la suite à un stress osmotique ou d'une carence nutritive,[234] et sont depuis longtemps considérés comme des réserves d'énergie et de phosphate. Outre cette fonction de stockage, de nombreuses études témoignent de l'activité des PolyP sur le nucléoïde. L'association spatiale des PolyP avec le chromosome bactérien, leur interaction avec des protéines liées à l'ADN et leur rôle dans la condensation de l'ADN ont permis de mettre en avant l'implication des PolyP dans la régulation de l'expression génique.[235–239] Par ailleurs, il a récemment été proposé que la synthèse de PolyP permettrait aux cellules de ralentir le transport de composants cytoplasmiques et de réduire l'accessibilité au nucléoïde.[240]

Les granules de PolyP sont polymérisés par l'activité de polyphosphate kinases (PPK).[233] Chez *P. aeruginosa*, il existe 4 gènes codant pour des PPK (*ppk1, ppk2a, ppk2b, ppk2c)*, dont deux (*ppk1* et *ppk2a*) sont essentiels à la formation de granules de PolyP lors d'une carence en azote.[236]
Afin de vérifier que les zones denses observées sont des granules de PolyP, des expériences supplémentaires de TEM ont été réalisées sur une souche mutante de *P. aeruginosa* PA14 délétée des gènes *ppk1* et *ppk2a* ainsi que sur la souche parentale PA14 cultivées dans un milieu carencé ou non en azote. Par souci d'homogénéité des résultats, l'effet de NV716 a également été testé dans le contexte PA14.
Le pourcentage de bactéries possédant des granules a été déterminé pour chacune des conditions (Fig. 34A). Contrairement aux bactéries PAO1, de nombreuses bactéries PA14 contiennent des granules en condition contrôle (absence de NV716 et milieu non carencé). Cette différence pourrait s'expliquer par une variabilité génétique entre les deux souches, ou bien être due aux milieux de culture utilisés dont les compositions diffèrent.

En effet, la souche PAO1 a été cultivée dans du milieu Luria-Bertani (LB) classique, tandis que les souches PA14 ont été cultivées dans du milieu minimum Gutnick afin de pouvoir contrôler la quantité d'azote. Concernant les bactéries PA14 cultivées en présence de NV716 ou en condition de carence d'azote, les pourcentages de bactéries possédant des granules sont similaires, et légèrement plus élevés que celui des bactéries PA14 contrôle. Enfin, l'absence presque totale de granules chez les bactéries mutantes PA14 ΔPolyP cultivées dans un milieu carencé en azote confirme que les zones denses observées sont bien des granules de PolyP.
Des clichés de bactéries de chaque condition sont présentés sur la figure 34B. Les images ayant été prises en champ sombre, les contrastes sont ici inversés.

A

	PA14	PA14 + NV716	PA14 Carence d'azote	PA14 ΔPolyP Carence d'azote
Nombre de bactéries	184	120	488	256
Nombre de bactéries avec granule(s)	60	43	176	3
Nombre de bactéries avec granule(s) (%)	**32.61**	**35.83**	**36.07**	**1.17**

B

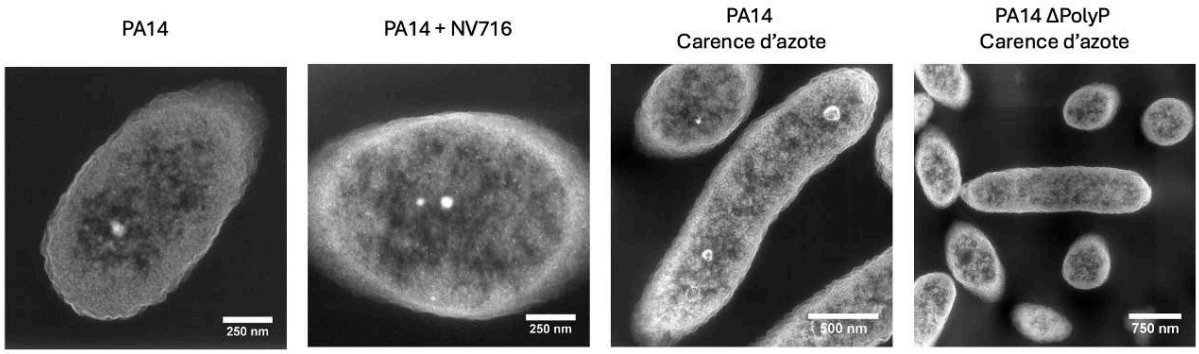


Figure 34 : (A) Détermination du pourcentage de bactéries PA14 possédant des granules. (B) Images de microscopie électronique en champ sombre. NV716 : 10 µM.

L'ensemble des résultats de MET indiquent que NV716 induit la formation de granules de PolyP chez *P. aeruginosa*. La formation de ces granules étant connue comme une réponse générale au stress, il ne serait pas étonnant que l'activité de NV716 sur la membrane externe crée un stress chez les bactéries, qui y répondraient en synthétisant des PolyP.
L'accumulation de PolyP a déjà été proposée comme mécanisme de protection des cellules contre la toxicité d'un antibiotique.[238] Ce rôle protecteur des PolyP a été constaté lors d'observation en MET des bactéries PA14 Δ*ppk1* et PA14 Δ*ppk1,2a* (ΔPolyP) présentant d'importants dommages structurels après traitement au NV716 (Fig. 35).

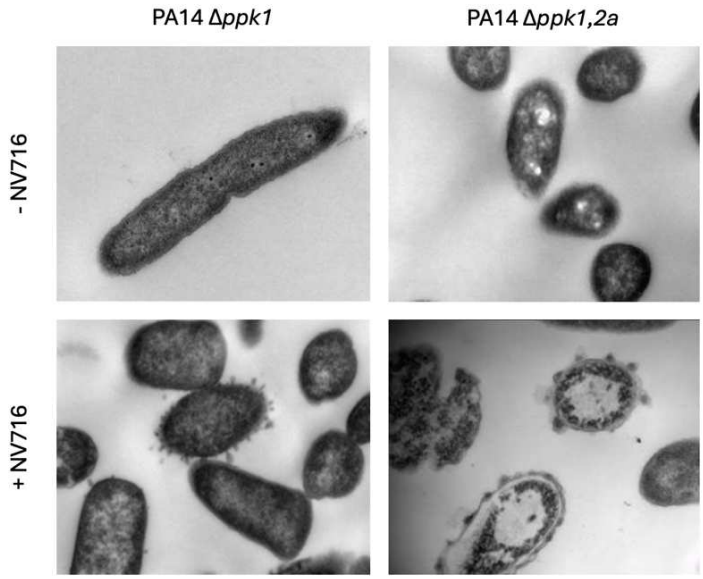


Figure 35 : Observation en microscopie électronique des bactéries PA14 Δ*ppk1* et PA14 Δ*ppk1,2a* traitées ou non au NV716 (10 µM).

Malgré sa résolution élevée, la MET impose de fixer l'échantillon, de le découper, puis de le colorer. Afin de s'affranchir de ces contraintes de préparation, et afin d'essayer d'obtenir un meilleur aperçu de l'impact de NV716 sur l'ultrastructure bactérienne, des expériences de cryo-tomographie aux rayons X (cryo-SXT) ont été réalisées.

3. Cryo-tomographie aux rayons X

La cryo-SXT (*cryo Soft XRay Tomography*) est une technique de microscopie plein champ de haute résolution spatiale utilisant un rayonnement X de basse énergie (X mous 280-520 eV). La préparation de l'échantillon ne nécessite pas de fixation chimique mais seulement une vitrification, c'est-à-dire une cryogénisation dans de l'éthane liquide afin d'éviter la formation de cristaux de glace. Ainsi, les cellules observées restent hydratées, dans un état proche de la nativité. Cette technique, notamment utilisée pour observer l'ultrastructure intacte de cellules cryo-préservées, présente de nombreux avantages. Tout d'abord, en plus de pouvoir observer des cellules proches de leur état natif, la technique est hautement résolutive. Comparée à la microscopie en lumière visible dont la limite de résolution spatiale est de l'ordre de 250 nm, elle est d'environ 30 nm en cryo-SXT. Ensuite, les photons utilisés pénètrent beaucoup plus facilement que les électrons à travers les échantillons biologiques. La profondeur de pénétration des rayons est de l'ordre de 10 µm, ce qui permet d'éviter de sectionner l'échantillon. Enfin, le temps d'acquisition d'une série d'images 2D, reconstituées par la suite en une image 3D, est relativement court, de quelques minutes seulement.
Les expériences de cryo-SXT ont été réalisées sur la ligne de lumière MISTRAL du synchrotron ALBA, situé près de Barcelone.[241,242] Les bactéries ont été observées avec des photons d'une région du spectre électromagnétique connue sous le nom de « fenêtre de l'eau », qui permet d'obtenir des contrastes dus à la différence d'absorption des composés cellulaires (Fig. 36). À l'énergie choisie de 520 eV, les éléments riches en carbone (ex. membranes) vont fortement absorber, tandis que les éléments riches en oxygène (ex. cytoplasme) vont absorber faiblement. De cette façon, il y a une relation directe entre le contraste et la composition élémentaire.

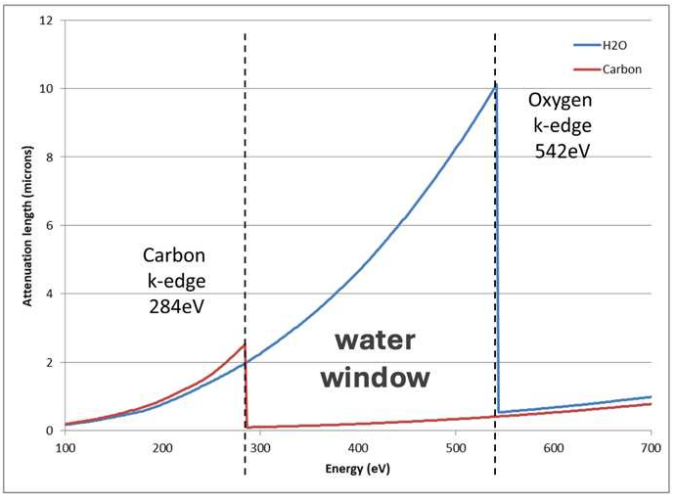
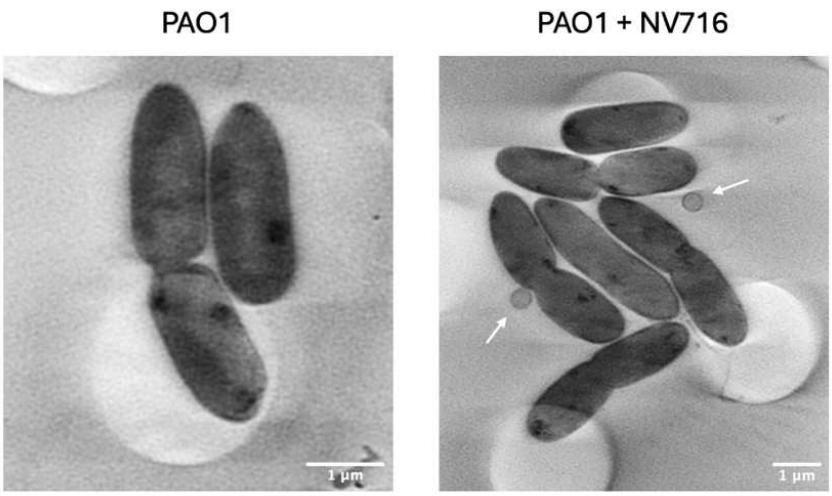


Figure 36 : Représentation graphique de la région du spectre électromagnétique appelée « fenêtre de l'eau » sur laquelle sont représentés les coefficients d'atténuation du carbone et de l'eau. (Adapté de Groen *et al.*)[243]

Des exemples de coupes tomographiques des bactéries PAO1 exposées ou non au NV716 ne montrent pas de dommages apparents au niveau de la structure des bactéries. Des vésicules extracellulaires sont cependant observées à proximité des bactéries (Fig. 37A).
Des pourcentages de vésicules pour chaque condition ont été déterminés à partir du nombre total de bactéries imagées et du nombre total de vésicules présentes (Fig. 37B). Les résultats témoignent d'une surproduction de vésicules chez les bactéries en présence de NV716.

A



B

	PAO1	PAO1 + NV716
Nombre total de bactéries	97	84
Nombre total de vésicules	23	31
Vésicules (%)	**23,7%**	**36,9%**

Figure 37 : (A) Coupes tomographiques de bactéries PAO1 traitées ou non au NV716 (10 µM) obtenues par cryo-SXT. Les flèches indiquent la présence de vésicules. (B) Détermination du pourcentage de vésicules présentes à proximité des bactéries sur les images de microscopie SXT.

Cependant, la quantité de vésicules observées par cette approche est sous-estimée. En effet, il fort probable qu'un nombre important de vésicules ait été perdu lors des étapes de préparation précédant la vitrification. Notamment, le protocole impose une étape de centrifugation des bactéries suite à leur incubation avec NV716 pour éliminer la molécule et arrêter son activité sur les bactéries. De ce fait, la majorité des vésicules en suspension dans le surnageant est éliminée. Également, après avoir déposé les bactéries sur la grille de microscopie, des vésicules ont pu être absorbées au travers des trous de la grille lors de l'étape de *blotting* permettant d'éliminer l'excès de tampon.
Afin de vérifier l'impact de NV716 sur la production de vésicules chez *P. aeruginosa*, les vésicules présentes dans le surnageant des bactéries en présence ou en absence de NV716 ont été collectées puis marquées au FM4-64. L'intensité de fluorescence des vésicules, mesurée par spectrofluorimétrie, permet de confirmer que NV716 induit une surproduction de vésicules chez les bactéries PAO1 (Fig. 38).

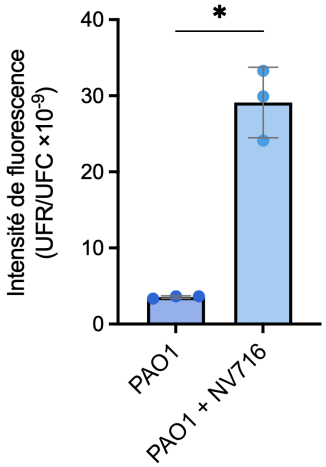


Figure 38 : Quantification par spectrofluorimétrie des vésicules produites par PAO1 en présence ou en absence de NV716 (10 µM) après marquage au FM4-64. UFR : Unité de fluorescence relative. UFC : Unité formant colonie.

La sécrétion de vésicules membranaires (VM) est un phénomène naturel survenant chez les organismes des trois domaines du vivants.[244,245] La taille des VM est très variable, pouvant aller de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres de diamètre. Chez les bactéries à Gram-négatif, il existe plusieurs types de VM classées selon leur structure et leur composition, qui dépendent de leur voie de sécrétion.[246] Les vésicules de membrane externe (OMV ; *Outer-Membrane Vesicles*), sécrétées par bourgeonnement de la membrane, peuvent contenir des protéines de membrane externe et des composants périplasmiques. Les vésicules composées de membranes externe et interne (OIMV ; *Outer-Inner Membrane Vesicles*) peuvent en plus contenir des protéines de membrane interne et des composants cytoplasmiques tels que des protéines ou des fragments d'ADN.[247] Les OIMV sont sécrétées dans le cas d'une lyse cellulaire explosive, suite à l'activité d'endolysines notamment,[248] tout comme un troisième type de vésicules appelées EOMV (*Explosive Outer-Membrane Vesicles*), formées de membrane externe et contenant du matériel cytoplasmique.
Les VM sont impliquées dans les mécanismes de survie et de pathogénie des bactéries.[249,250] Elles contribuent à l'acquisition de nutriments, à la formation de biofilm, servent à la sécrétion de facteurs de virulence, à l'élimination de toxines ou d'agrégats protéiques, permettent la diffusion de molécules de communication, d'enzymes bactériolytiques dans des cas de compétition avec d'autres espèces bactériennes, etc.

Des études de protéomiques ont récemment montrées que les mécanismes de biogénèse des VM déterminaient la composition en molécules, et par conséquent, le rôle des VM.[251]

Les bactéries produisent des OMV naturellement, mais le phénomène de vésiculation est également connu comme un mécanisme réponse à une perturbation de l'enveloppe induite par l'activité de facteurs externes tels que des antibiotiques.[252,253] La production de vésicules constitue un mécanisme de défense pour les bactéries qui s'en servent pour éliminer les molécules déstabilisant la membrane externe ou pour atténuer leur activité en utilisant les vésicules comme des leurres. Les OMV contribuent ainsi à la protection des cellules vis-à-vis de molécules ciblant la membrane externe. L'augmentation de la production de vésicules observée chez *P. aeruginosa* en présence de NV716 serait donc un moyen de capturer des molécules de NV716 avant qu'elles n'atteignent leur cible à la surface bactérienne.

Afin de déterminer la composition et le type de vésicules sécrétées en présence de NV716, les vésicules collectées ont de nouveau été marquées au FM4-64, ainsi qu'au Hoechst, un marqueur d'acides nucléiques. Le marquage des lipides par le FM4-64 permet de visualiser les vésicules en microscopie à fluorescence, qui apparaissent sous formes de points fluorescents (Fig. 39A). Comme attendu, la quantité de vésicules est plus importante en présence qu'en absence de NV716. Concernant le Hoechst, l'absence de fluorescence indique que les vésicules ne contiennent pas d'ADN.
Également, la présence de LPS à la surface des vésicules a été examinée par dot-blot en utilisant un anticorps dirigé contre le lipide A. La forte intensité du signal observée pour les vésicules produites en présence de NV716 permet de confirmer que les vésicules contiennent du LPS (Fig. 39B).

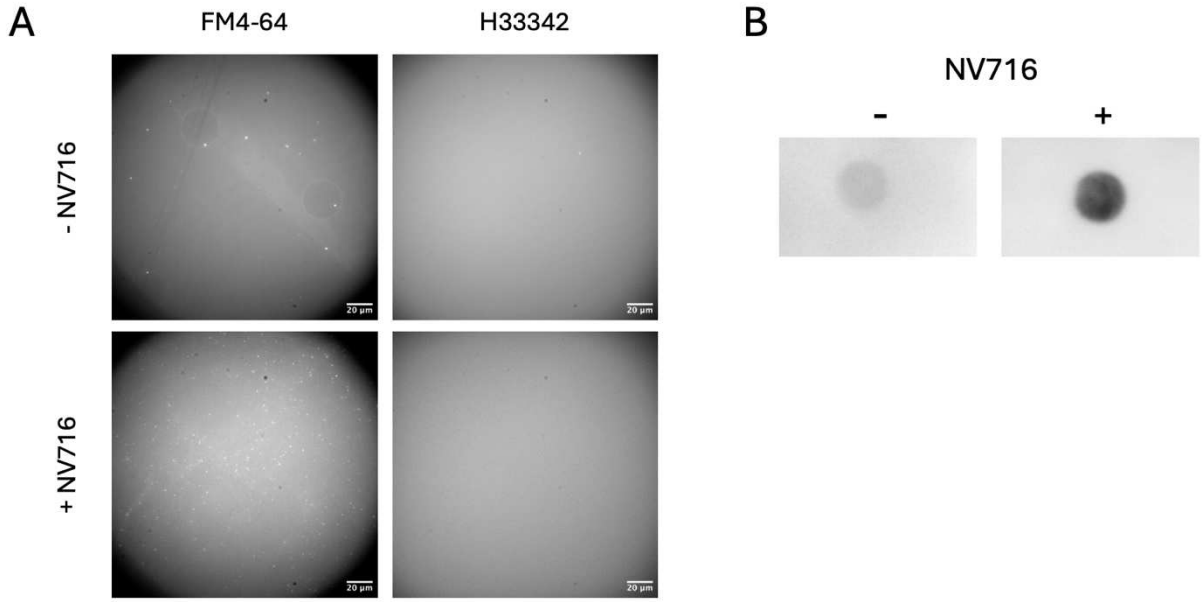


Figure 39 : (A) Observation par microscopie à fluorescence des vésicules produites par PAO1 en présence ou en absence de NV716. Les vésicules ont été marquées au FM4-64 (filtre d'excitation : 542-582 nm ; filtre d'émission : 603-678 nm) et au Hoechst (H33342) (filtre d'excitation : 352-402 nm ; filtre d'émission : 417-477 nm). (B) Immunodétection du LPS présent à la surface des vésicules produites en présence ou en absence de NV716.

Ces résultats semblent indiquer que les vésicules sont bien des OMV. Toutefois, des expériences complémentaires sont prévues pour renforcer cette idée. Notamment, des analyses par Western Blot avec des anticorps dirigés contre des protéines de ME, de MI, périplasmiques, et cytoplasmiques permettraient de conclure quant à la composition des vésicules. Également, des analyses des vésicules en cryomicroscopie électronique sont en prévision grâce à la récente acquisition du microscope Titan Krios POLARIS à SOLEIL afin de certifier la présence d'une ou de deux membranes (voir conclusion).[254]

Pour revenir aux résultats de cryo-SXT, outre la présence de vésicules, des composés cellulaires à forte absorption sont visibles dans les bactéries sous forme de foyers sombres (Fig. 37A). L'énergie des photons utilisés en cryo-SXT (520 eV) ne permet pas de visualiser le phosphore (seuil K à 2150 eV). Il est donc impossible qu'il s'agisse de granules de PolyP. L'élément le plus à même d'être présent dans ces foyers est le carbone qui absorbe fortement à 520 eV (Fig. 37).
Par ailleurs, l'observation en cryo-SXT du mutant PA14 ΔPolyP montre que ces amas sont toujours présents, validant le fait qu'il ne s'agisse pas de granules de PolyP (Fig.40).

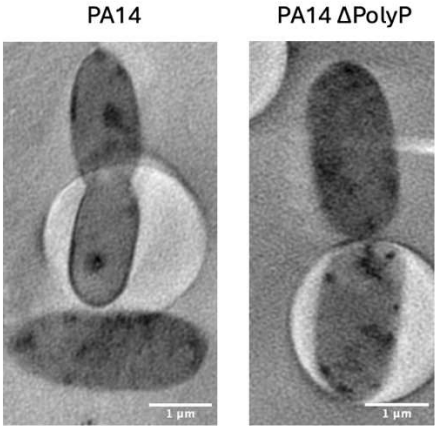


Figure 40 : Coupes tomographiques de bactéries PA14 et PA14 ΔPolyP obtenues par cryo-SXT.

D'après la littérature, il pourrait s'agir de granules de polyhydroxyalcanoates (PHA). Les PHA sont des polymères de carbone synthétisés par des PHA synthases, à partir de molécules d'acétyl-coenzyme A.[255] Leur accumulation sous forme de granules chez les bactéries est depuis longtemps connue pour servir de réserves de carbone et d'énergie, mais de la même manière que les PolyP, les PHA possèdent plusieurs autres fonctions.[256,257] Les granules de PHA sont recouverts de nombreuses protéines fonctionnelles qui leur a valu le nom de carbonosomes.[258] Plusieurs études indiquent une localisation des PHA à proximité du nucléoïde, avec lequel ils interagissent via leurs protéines de surface.[259,260] Les PHA sont synthétisés lors d'un stress environnemental ou nutritif lorsqu'une source de carbone est disponible, et de façon intéressante, il est connu qu'une carence en azote induise la formation de granules de PHA.[261,262]

Suite à ces informations, il a été remarqué sur les images précédemment obtenues par MET, la présence de structures internes auxquelles aucune attention n'avait été portée jusqu'alors (Fig. 41). Ces structures sombres, qui apparaissent sur les images prises en contraste inversé, ressemblent fortement aux granules de PHA décrites dans la littérature.

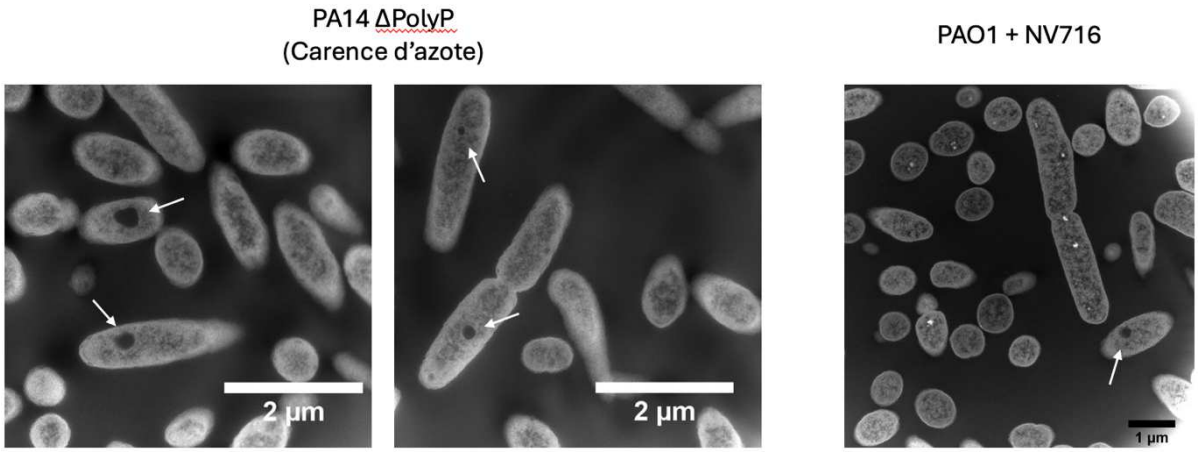


Figure 41 : Observation en microscopie électronique en champ sombre de bactéries PA14 ΔPolyP cultivées en conditions de carence d'azote et de bactéries PAO1 traitées au NV716. Les flèches indiquent la présence de zones pouvant correspondre à des granules de PHA.

Ainsi, il est fort probable que les foyers sombres observés dans les bactéries en cryo-SXT soient des granules de PHA. L'observation en cryo-SXT et MET de mutants incapables de synthétiser des PHA permettrait de conclure quant à la nature de ces granules. En revanche, l'analyse EDX de ces zones serait inutile en raison de la présence de carbone dans la résine d'enrobage des échantillons.

L'observation de ces granules est indépendante de l'exposition des bactéries au NV716. Il est compliqué d'affirmer un quelconque effet de NV716 sur leur formation. Une quantification du nombre de granules présents dans les bactéries de chaque condition pourrait toutefois permettre d'établir l'impact de NV716 vis-à-vis de ces granules.

Les granules de PHA, comme les granules de PolyP, étant synthétisés en réponse à divers stress, il est tout à fait possible que l'activité de NV716 sur la membrane externe induise leur production. Des temps d'incubation plus longs des bactéries avec NV716 permettrait sûrement de mieux caractériser ces deux types de granules. En effet, dans les études s'intéressant à leur biogénèse, un stress est créé sur plusieurs heures,[236,263] contre seulement 30 minutes avec NV716.

4. Microscopie à fluorescence aux rayons X

Une dernière technique de microscopie également basée sur le rayonnement X, a été menée dans l'objectif de déterminer visuellement la localisation de NV716 chez les bactéries. Les expériences ont été réalisées à l'ESRF, le synchrotron européen situé à Grenoble, sur la ligne de lumière ID16A qui permet de faire de la fluorescence aux rayons X (XRF ; *X-ray fluorescence*) à l'échelle nanométrique en conditions cryogéniques.
La XRF est une technique d'imagerie quantitative qui repose sur la fluorescence aux rayons X des éléments. Comme en cryo-SXT, l'échantillon est cryo-préservé hydraté suite à sa vitrification dans l'éthane liquide. Ainsi, cette technique permet d'avoir accès à la composition élémentaire de l'échantillon proche de l'état natif.

L'intérêt porté à la technique repose ici sur la possibilité de localiser un élément à haute résolution spatiale. Basé sur cette idée, NV716 a été couplé à du cuivre afin de pouvoir déterminer sa localisation au travers de celle du cuivre. L'énergie d'excitation a été fixée à 17 keV, ce qui permet de collecter la fluorescence de plusieurs éléments dont celle du phosphore et du cuivre.
Le phosphore est un élément abondant dans les bactéries, en particulier dans les acides nucléiques. L'ADN bactérien occupant la majorité du volume cytoplasmique, la fluorescence du phosphore permet de délimiter globalement le contour des bactéries.

Des bactéries PAO1 en présence ou en absence de NV716-Cu ont ainsi été imagées par XRF (Fig. 42). Comme attendu, la fluorescence du phosphore est homogène dans les deux conditions, et le cuivre n'est pas détecté dans les bactéries non traitées. En revanche, la distribution de la fluorescence du cuivre dans les bactéries traitées est hétérogène et semble au premier abord être concentrée majoritairement au niveau des contours des bactéries. Cependant, les rayons X traversant la totalité du volume des bactéries, il est difficile de conclure avec certitude sur la localisation de NV716.

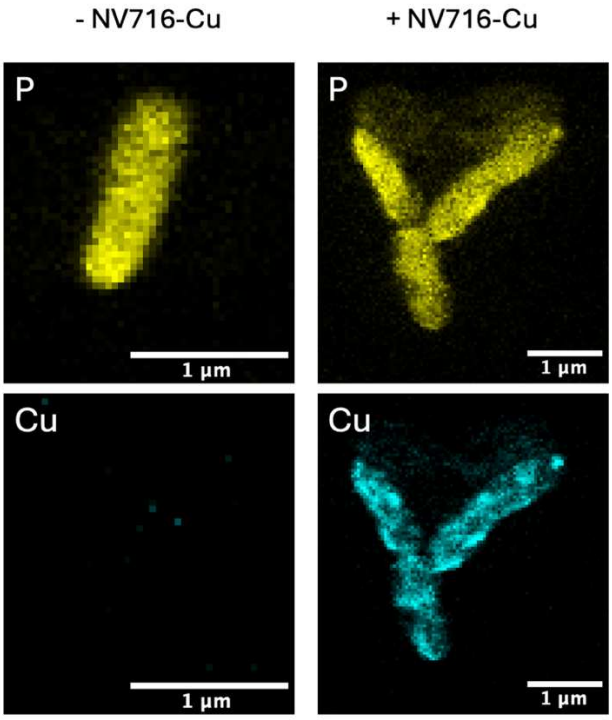


Figure 42 : Observation par microscopie XRF de bactéries PAO1 traitées ou non au NV716-Cu (10 µM). Les fluorescences du phosphore (P) et du cuivre (Cu) sont représentées en jaune et cyan respectivement.

En plus de cartographies 2D des échantillons, la ligne de lumière ID16A permet d'effectuer des tomographies de fluorescence X. La visualisation 3D des bactéries aurait en effet pu renseigner plus exactement sur la localisation de NV716 à la surface ou non des bactéries. Contrairement à la cryo-SXT qui permet d'effectuer une tomographie en quelques minutes, la durée de l'acquisition en XRF est de plusieurs heures. Le temps de faisceau obtenu sur ID16A n'a ainsi pas permis d'avoir recours à la fluo-tomographie.

VI) Test de survie chez le modèle d'infection *Galleria mellonella*

Pour terminer cette partie de ma thèse consacrée à l'étude de l'activité et du mode d'action de NV716, l'effet de NV716 a été testé *in vivo* sur le modèle d'infection *Galleria mellonella*.[264,265]
Les chenilles ont été infectées par des bactéries de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, puis un traitement constitué de doxycycline combiné ou non à NV716 leur a été injecté. La survie des chenilles a été suivie sur trois jours. L'absence de toxicité de la doxycycline et du NV716 a été vérifiée sur des chenilles non infectées, de même que l'absence d'activité antibactérienne de NV716 chez des chenilles infectées.

Les chenilles infectées n'ayant pas reçu de traitement meurent toutes en 24h, tandis que la moitié de la population de chenilles traitées avec la doxycycline +/- NV716 a survécu après 48h (Fig. 43). L'impact de NV716 sur la survie ne devient visible qu'à partir du troisième jour. En effet, la présence de NV716 permet de presque tripler le pourcentage de survie des chenilles, qui est de 40% au troisième jour contre seulement 15% pour les chenilles ayant reçu un traitement de doxycycline seule. Ainsi, ces résultats permettent de démontrer le potentiel de NV716 comme adjuvant de la doxycycline pour traiter des infections à *P. aeruginosa in vivo*.

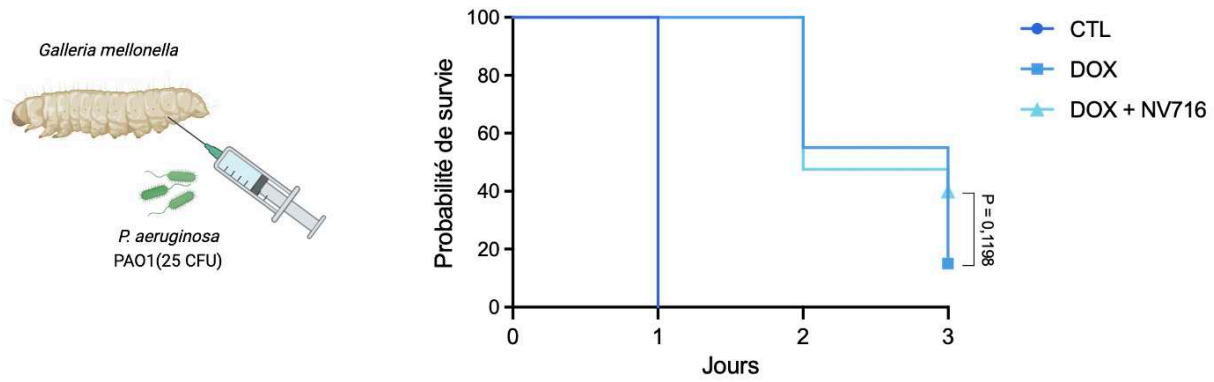


Figure 43 : Taux de survie des chenilles *Galleria mellonella* infectées par *P. aeruginosa* PAO1 puis traitées à la doxycycline seule (DOX 50 mg/Kg) ou combinée à NV716 (DOX 50 mg/Kg + NV716 5 µM). CTL : contrôle ; chenilles infectées n'ayant pas reçu de traitement. n = 40 pour chaque condition.

Partie 2 : Quantification et localisation d'un dérivé métallique de la ciprofloxacine chez *Escherichia coli*

L'activité des antibiotiques dépend de leur capacité à s'accumuler à l'intérieur des bactéries, à proximité de leur cible intracellulaire. Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, la surexpression des pompes d'efflux couplée à la perte ou à la diminution de l'expression des porines entraine bien souvent une chute de la concentration intracellulaire des antibiotiques en-dessous d'un seuil critique pour leur activité à l'origine des phénotypes de multirésistance. Dans ce cadre, la quantification de l'accumulation des antibiotiques est cruciale afin de guider le développement de nouvelles molécules antibactériennes pour limiter leur reconnaissance par les pompes d'efflux et optimiser leur perméation à travers la ME. Le recours à la spectrométrie de masse pour mesurer la pénétration et l'accumulation d'antibiotiques dans des souches présentant différents niveaux de perméabilité est rapporté dans de nombreuses études.[34,266–269] Pendant plusieurs années, l'unité MCT a également développé des approches basées sur les propriétés de fluorescence intrinsèques des fluoroquinolones et des tétracyclines. A l'échelle de la population bactérienne, la spectrofluorimétrie offre un moyen robuste de quantifier l'accumulation d'antibiotiques après différents temps d'exposition. A l'échelle de la bactérie, la microscopie à fluorescence UV basée sur le rayonnement synchrotron permet de suivre les cinétiques d'accumulation des antibiotiques. Cette deuxième approche est toutefois limitée par sa résolution spatiale d'environ 100 nm et par l'absence de calibration de la fluorescence permettant de quantifier des concentrations en antibiotiques dans des bactéries isolées.
La microscopie de Fluorescence des Rayons X (XRF) décrite précédemment apparaît être un technique pertinente pour répondre à ces limitations. En effet, cette technique a été utilisée à plusieurs reprises pour localiser et quantifier des composés métalliques anticancéreux dans des cellules tumorales.[270–273]

Cette deuxième partie de ma thèse traite de l'utilisation de la microscopie XRF pour quantifier l'accumulation de la ciprofloxacine dans des bactéries isolées d'*E. coli*. La technique ne permettant pas de s'appuyer sur les propriétés de fluorescence intrinsèque de la ciprofloxacine, un complexe ternaire de la ciprofloxacine couplée à du cuivre a été utilisé.[274,275]

I. Comparaison de l'accumulation de la ciprofloxacine et de son dérivé métallique

Les différences structurelles de la ciprofloxacine (Cip) et de son dérivé métallique (CuCip)[275,276] (voir Matériels et Méthodes) imposent de s'assurer des propriétés chimiques et fonctionnelles du dérivé. Après vérification de l'activité antibactérienne et des propriétés spectrales de CuCip, son accumulation dans les souches AG100 et AG100A d'*E. coli* a été mesurée et comparée à celle de la ciprofloxacine.

1. Mesure par spectrofluorimétrie sur les populations bactériennes

L'accumulation de CuCip a dans un premier temps été quantifiée par spectrofluorimétrie chez la souche sauvage AG100 et chez le mutant dépourvu d'efflux AG100A. Après 15 minutes d'exposition des bactéries à l'antibiotique, la quantité de molécules accumulées a été mesurée dans des lysats bactériens (Fig. 44). La différence d'accumulation de CuCip entre les souches AG100 et AG100A est comparable à celle mesurée pour Cip. Également, les bactéries des deux souches accumulent Cip et CuCip à des niveaux similaires.

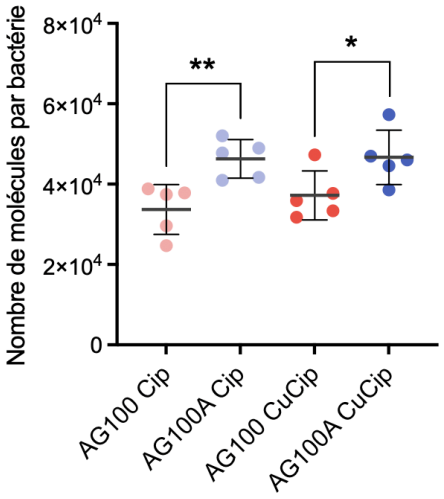


Figure 44 : Accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine et de son dérivé CuCip chez les souches *E. coli* AG100 (efflux +) et AG100A (efflux -) exprimée en nombre de molécules antibiotiques par bactérie. La fluorescence de Cip et CuCip est mesurée dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie après 15 minutes d'incubation. Cip, CuCip : 5 µM.

2. Mesure par microscopie à fluorescence UV sur bactéries uniques

L'accumulation de CuCip a ensuite été mesurée par microscopie à fluorescence UV sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL. Le dispositif de microfluidique décrit précédemment n'ayant pas encore été développé au moment où ces expériences ont été menées, les mesures d'accumulation ont été faites suivant la méthode classique (sans microfluidique).
Les accumulations de Cip et de CuCip ont été suivies au cours du temps dans des bactéries isolées des souches AG100 et AG100A (Fig. 45A). Chaque courbe correspond à la fluorescence moyenne mesurée chez l'ensemble des bactéries isolées. Les intensités de fluorescence mesurées dans chacune des bactéries à t = 15 minutes sont représentées sur la figure 45B. Similairement aux résultats obtenus par spectrofluorimétrie, la différence d'accumulation entre les deux souches est équivalente pour Cip et CuCip.

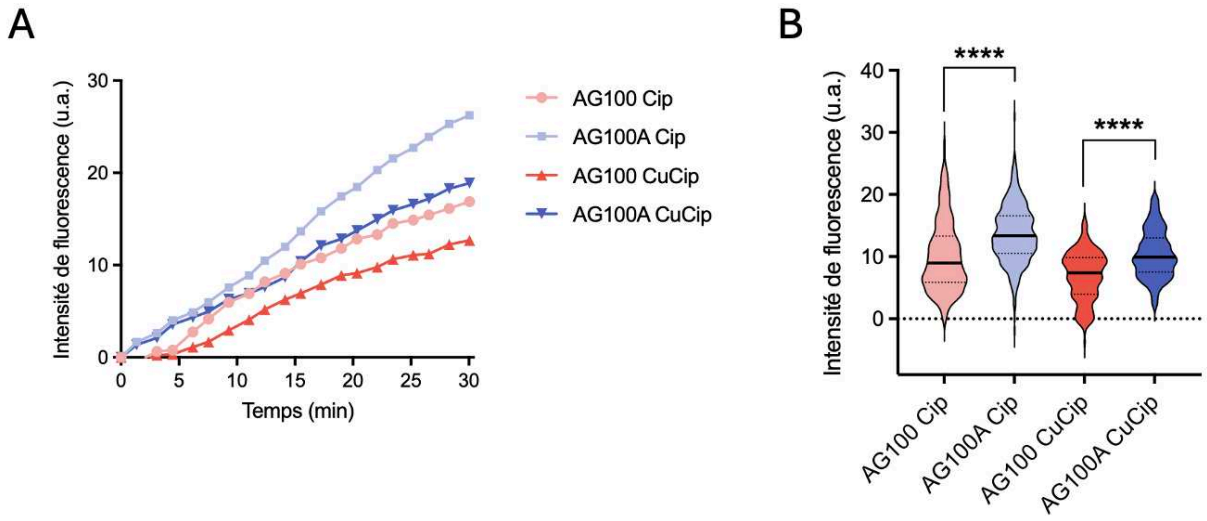


Figure 45 : (A) Suivi au cours du temps de l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine et de son dérivé CuCip chez les souches *E. coli* AG100 (efflux +) et AG100A (efflux -) par microscopie à fluorescence UV. Chaque courbe est une moyenne de la fluorescence mesurée dans des bactéries isolées. (B) Intensités de fluorescence mesurées dans des bactéries isolées à t=15 minutes. Cip, CuCip : 5 µM.

L'ensemble des résultats obtenus par spectrofluorimétrie et microscopie à fluorescence UV confirme que le composé CuCip possède des caractéristiques d'accumulation semblables à celles de la Cip chez les souches AG100 et AG100A d'*E. coli*.
Ainsi, le composé CuCip a pu être utilisé pour mesurer la quantité de molécules d'antibiotiques s'accumulant dans des bactéries isolées par microscopie XRF.

II. Quantification et localisation du dérivé antibiotique par fluorescence aux rayons X

Les bactéries des souches AG100 et AG100A ont été exposées à CuCip pendant 15 minutes avant d'être vitrifiées dans de l'éthane liquide. Les expériences ont été réalisées sur la ligne de lumière ID16A de l'ESRF qui permet de mesurer simultanément la fluorescence X d'une large gamme d'éléments (ex : P, S, Cl, K, Ca, Mn, Ni, Cu, Zn).
Pour chacune des conditions testées, la fluorescence du phosphore et celle du cuivre ont été mesurées (Fig. 46). Comme précédemment, la fluorescence du phosphore nous a permis de délimiter le contour des bactéries. La fluorescence du cuivre quant à elle est proportionnelle à la présence de l'antibiotique.

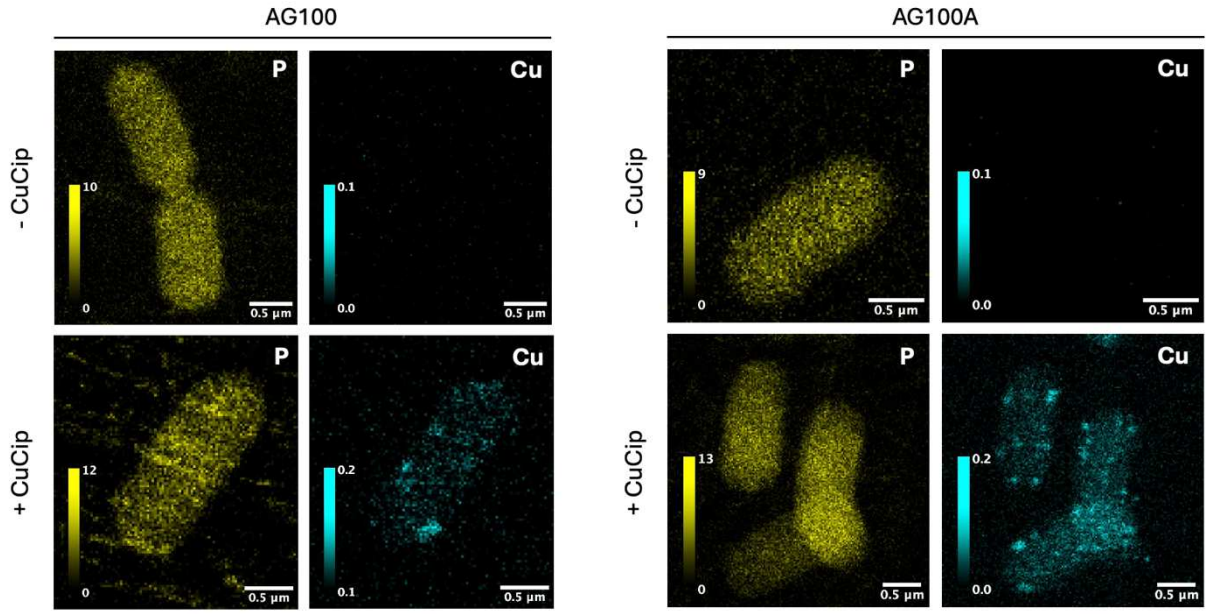


Figure 46 : Observation par microscopie XRF de bactéries AG100 et AG100A exposées ou non à CuCip (5 µM). Les fluorescences du phosphore (P) et du cuivre (Cu) sont représentées en jaune et cyan respectivement. Les barres de calibration sont exprimées en ng/mm^2.

1. Quantification

La microscopie XRF est une technique quantitative qui permet de relier l'intensité de fluorescence d'un élément à sa densité, exprimée en ng/mm^2. Ainsi, le phosphore et le cuivre ont été quantifiés dans chacune des bactéries cartographiées (Fig. 47).
Concernant le phosphore, la quantité mesurée dans les bactéries est comparable d'une condition à l'autre (Fig. 47A). La quantité de cuivre, donc d'antibiotique, est en revanche plus élevée en moyenne dans les bactéries AG100A sans efflux comparé aux bactéries AG100 (Fig. 47B). Comme attendu, la présence de cuivre n'a pas été détecté dans les bactéries contrôles non exposées à CuCip (Fig. 46 et 47B).

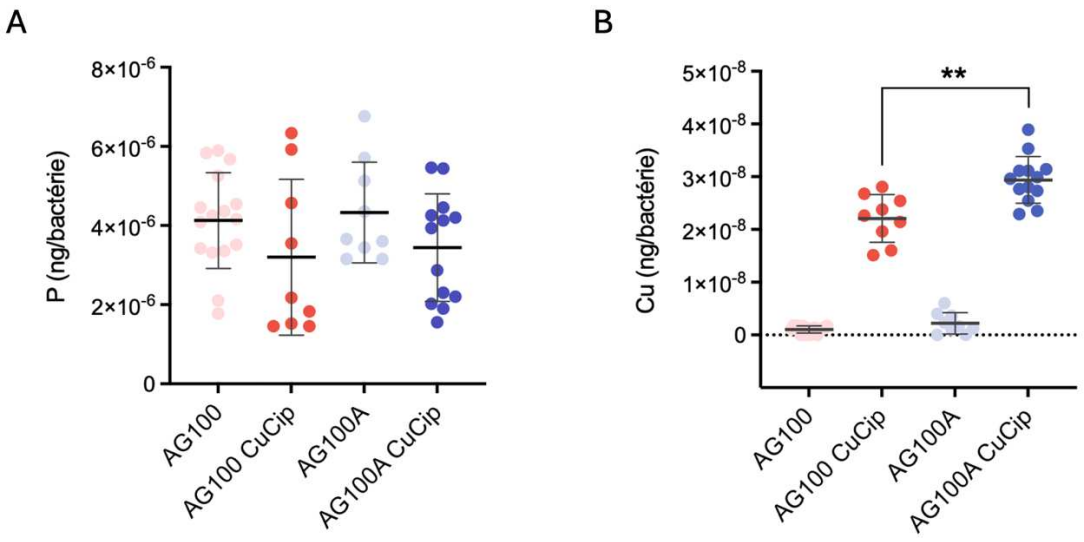


Figure 47 : Quantification en ng par bactérie du phosphore (A) et du cuivre (B) dans les bactéries AG100 et AG100A exposées ou non à CuCip. Chaque point correspond à une bactérie.

Afin de caractériser le rôle de l'efflux sur l'accumulation de CuCip, l'index d'efflux SICAR, qui correspond au ratio du nombre moyen de molécules d'antibiotiques accumulées chez AG100A par rapport à celui chez AG100, a été calculé pour les trois techniques de mesure d'accumulation (Tab. 4). Globalement, les valeurs de SICAR pour CuCip sont du même ordre pour les trois méthodes et comparables à celles calculées pour Cip.

	Spectrofluorimétrie	Microscopie à fluorescence UV	XRF
Cip	1,37	1,33	
CuCip	1,25	1,48	1,33

Tableau 4 : Index d'efflux SICAR de Cip et CuCip en spectrofluorimétrie, microscopie à fluorescence UV, et microscopie XRF pour un temps d'exposition des bactéries à l'antibiotique de 15 minutes.

Ces résultats démontrent que la microscopie XRF est une technique fiable pour quantifier l'accumulation intracellulaire d'un antibiotique dans des bactéries, et témoignent de la complémentarité des trois méthodes.

2. Localisation

En plus de pouvoir quantifier les éléments, la microscopie XRF permet de les localiser grâce à sa résolution spatiale élevée et à la possibilité d'effectuer des tomographies de fluorescence X. En effet, la tomographie permet de visualiser en trois dimensions la répartition des éléments dans l'échantillon. Ainsi, des tomographies de bactéries ont pu être acquises en plus des cartographies 2D pendant le temps de faisceau. Les reconstitutions 3D ont permis de confirmer la localisation intracellulaire de CuCip (Fig. 48B).

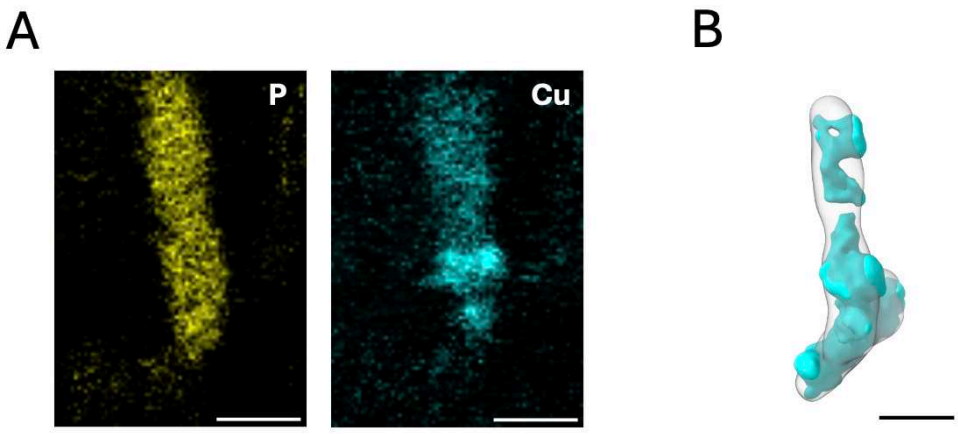


Figure 48 : (A) Coupes tomographiques d'une bactérie AG100A exposée à CuCip. Les fluorescences du phosphore (P) et du cuivre (Cu) sont représentées en jaune et cyan respectivement. (B) Reconstitution 3D de la tomographie. Les surfaces grise transparente et cyan correspondent au phosphore et au cuivre respectivement. Échelles : 1 µm

En raison de problèmes liés aux traitements des données des tomographies (normalisation), la quantification des éléments en ng/mm^3 n'a pas pu être effectuée.

La répartition hétérogène du cuivre dans les bactéries et la présence de foyers fluorescents (Fig. 46 et 48) nous a conduit à nous interroger sur la fixation de CuCip à une molécule spécifique.
Les topoisomérases de type II sont des enzymes essentielles qui régulent la topologie de l'ADN lors de sa réplication et de sa transcription en effectuant des clivages double brin de l'ADN. L'activité de la topoisomérase IV se concentre préférentiellement en aval de la fourche de réplication où elle va décaténer les molécules d'ADN, tandis que la gyrase va permettre le relâchement de l'hélice d'ADN en amont de la fourche de réplication et de l'ARN polymérase en induisant des supertours négatif.[277,278] Les deux enzymes sont des hétérotétramères composées de deux sous-unités liées à l'ADN et de deux sous-unités possédant une activité ATPase, respectivement GyrA et GyrB pour la gyrase et ParC et ParE pour la topoisomérase IV. Chez *E. coli*, environ 300 protéines gyrase sont liées en permanence tout le long du chromosome, dont une dizaine sont rassemblées au niveau des fourches de réplication.[279] La gyrase est la cible préférentielle de la ciprofloxacine chez *E. coli*. Elle cible les gyrases fonctionnelles et inhibe leur activité en se fixant aux complexes gyrase-ADN.[280] Des mutations dans des régions des sous-unités GyrA et GyrB, qualifiées de régions QRDR (*Quinolone Resistance-Determining Region*), sont à l'origine de résistances à la ciprofloxacine.[281,282]

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les foyers fluorescents observés étaient dus à la fixation de CuCip aux gyrases, des souches AG100 Gyr et AG100A Gyr dérivées de AG100 et AG100A mutées au niveau des régions QRDR de GyrA ont été utilisées pour la suite des expériences.

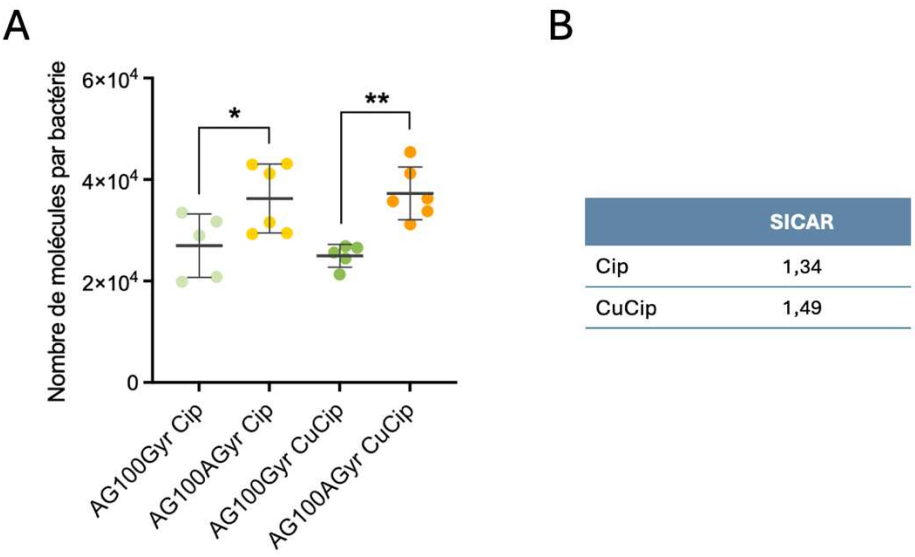
III. Étude de l'accumulation de la ciprofloxacine et de son dérivé métallique dans des mutants Gyr d'*Escherichia coli*

Dans un premier temps, des tests de sensibilité ont été menés afin de s'assurer de la résistance des souches AG100 Gyr et AG100A Gyr à la Cip et à CuCip. Les CMI de Cip et CuCip augmentent d'un facteur 16 et 64 chez AG100 Gyr et AG100A Gyr comparé à AG100 et AG100A respectivement (Tab. 5). Ces résultats confirment que les mutants Gyr sont résistants à Cip et CuCip qui ne peuvent plus accéder à leur cible.

	AG100	AG100A	AG100 Gyr	AG100A Gyr
Cip	0,016	0,004	0,256	0,256
CuCip	0,016	0,004	0,256	0,256

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices de la ciprofloxacine (Cip) et de son dérivé (CuCip) chez les souches d'*E. coli* AG100 et AG100A et chez leurs mutants respectifs AG100 Gyr et AG100A Gyr. Les valeurs sont en µg/mL.

Des expériences d'accumulation par spectrofluorimétrie ont été menées en parallèle. Après 15 minutes d'exposition des bactéries AG100 Gyr et AG100A Gyr à la Cip ou à CuCip, la quantification de l'accumulation dans les lysats bactériens indique une différence significative entre AG100 Gyr et AG100A Gyr dépourvu d'efflux pour les deux antibiotiques (Fig. 49A). Les valeurs de SICAR calculées sont comparables pour Cip et CuCip (Fig. 49B) et comparables avec celles calculées précédemment pour les souches AG100 et AG100A (Tab. 5).



	SICAR
Cip	1,34
CuCip	1,49

Figure 49: (A) Accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine et de son dérivé CuCip chez les souches *E. coli* AG100 Gyr et AG100A Gyr exprimée en nombre de molécules antibiotiques par bactérie. La fluorescence de Cip et CuCip est mesurée dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie après 15 minutes d'incubation. Cip, CuCip : 5 µM. (B) Index d'efflux SICAR correspondant au ratio du nombre moyen de molécules d'antibiotiques accumulées dans une souche dépourvu d'efflux comparé à celui dans une souche pourvu d'efflux.

Après avoir vérifié que les souches mutées au niveau de la gyrase étaient bien résistantes à CuCip et que son accumulation dans les souches n'était pas affectée, la distribution de CuCip dans les bactéries a pu être observée par microscopie XRF. Le composé CuCip ne pouvant plus se fixer à la gyrase, une répartition homogène de la fluorescence du cuivre est attendue. Pour des questions de temps, seule la souche AG100A Gyr a été préparée.

Étonnamment, la répartition de CuCip toujours hétérogène dans les bactéries AG100A Gyr (Fig. 50) indique que les foyers fluorescents observés ne sont pas dus à l'interaction de CuCip avec la gyrase.

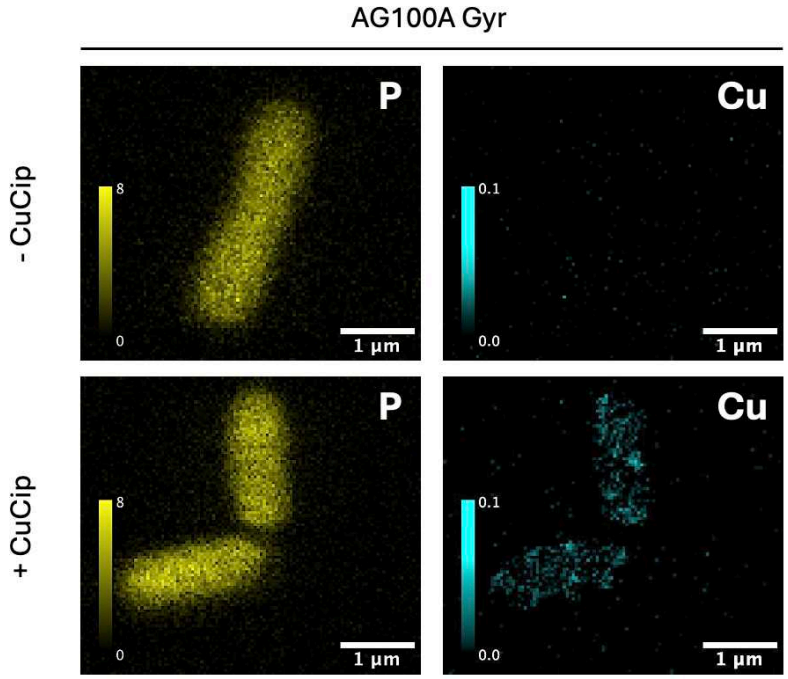


Figure 50 : Observation par microscopie XRF de bactéries AG100A Gyr exposées ou non à CuCip (5 µM). Les fluorescences du phosphore (P) et du cuivre (Cu) sont représentées en jaune et cyan respectivement. Les barres de calibration sont exprimées en ng/mm^2.

Par ailleurs, les quantifications du phosphore (Fig. 51A) et du cuivre (Fig. 51B) dans chacune des bactéries AG100A Gyr sont comparables à celles des bactéries AG100A déterminées précédemment, indiquant une fois de plus que l'accumulation de CuCip n'est pas affectée par les mutations de la gyrase.

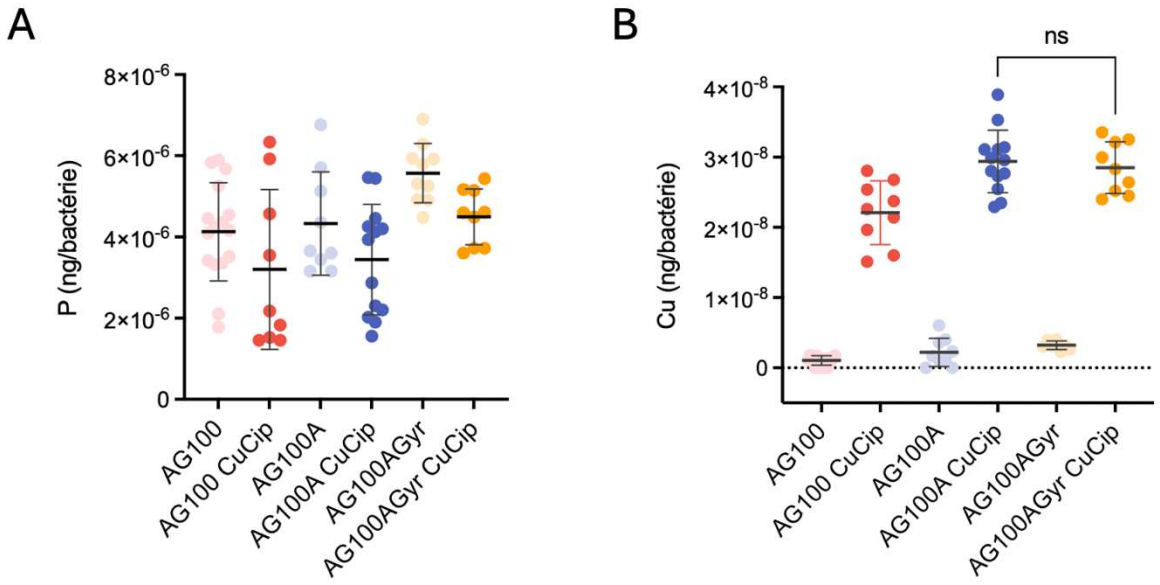


Figure 51 : Quantification en ng par bactérie du phosphore (A) et du cuivre (B) dans les bactéries AG100, AG100A et AG100A Gyr exposées ou non à CuCip. Chaque point correspond à une bactérie.

L'observation de foyers fluorescents dans les bactéries n'étant pas due à l'interaction de CuCip avec les gyrases, nous avons envisagé la possibilité d'une liaison non-spécifique de CuCip d'agrégats protéiques. En effet, la toxicité du cuivre envers les bactéries est connue en raison de sa capacité à induire la production de ROS mais également à entraîner l'agrégation des protéines.[283–285] La présence d'agrégats n'a toutefois pas été observée lors de l'analyse par SDS-PAGE du contenu protéique des fractions soluble et insoluble des souches d'*E. coli* exposées à CuCip.
Finalement, ces foyers fluorescents pourraient s'expliquer par la capacité des molécules de CuCip à polymériser entre elles. En effet, l'étude par cristallographie aux rayons X du complexe ternaire Cu-cpx-phen, ici appelé CuCip, a en effet révélé la formation de polymères.[275] Ainsi, il est probable que l'accumulation de polymères dans les bactéries soit à l'origine de l'observation de foyers fluorescents.

Conclusion

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique qui s'accentue avec l'absence de la mise sur le marché de nouvelles molécules. Parmi les espèces bactériennes classées prioritaires par l'OMS, la majorité sont des bactéries à Gram-négatif, particulièrement problématiques en raison de leur imperméabilité membranaire. La composition de la membrane externe couplée à la présence de pompes d'efflux constitue une véritable barrière à l'accumulation des antibiotiques. Cette imperméabilité intrinsèque renforcée par une diminution de l'expression des porines et par une surexpression des pompes d'efflux est à l'origine de la multirésistance aux antibiotiques.
Face à ces résistances, le développement de molécules ciblant la membrane externe apparaît comme une évidence. Parmi les différentes approches étudiées, l'élaboration de nouveaux antibiotiques se concentre à la fois sur les machineries de biogénèse et sur la structure de la membrane externe. Une alternative au développement de nouvelles molécules antibactériennes est de recourir à des molécules adjuvantes, dont le mécanisme d'action peut être d'inhiber l'efflux ou de perméabiliser la membrane externe, permettant de restaurer l'accumulation et donc l'activité d'antibiotiques et/ou de créer de nouvelles sensibilités.

J'ai plusieurs fois rappelé dans ce manuscrit que l'activité d'un antibiotique dépendait de sa capacité à s'accumuler dans les bactéries pour atteindre une concentration suffisante à son activité. Dans ce cadre, les approches permettant de quantifier cette accumulation est indispensable pour mesurer l'effet de molécules adjuvantes en développement. Le laboratoire MCT, en collaboration avec la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL, travaille depuis plusieurs années à l'élaboration de techniques de quantification par fluorimétrie, basées sur les propriétés de fluorescence intrinsèque d'antibiotiques. D'une part, la spectrofluorimétrie permet de quantifier l'accumulation d'antibiotiques dans une population bactérienne. D'autre part, la microscopie à fluorescence UV permet de mesurer des cinétiques d'accumulation dans des bactéries isolées.

Le premier objectif de ma thèse était d'étudier l'impact de la molécule adjuvante NV716 sur l'accumulation intracellulaire de deux antibiotiques, la ciprofloxacine et la doxycycline, chez deux modèles de bactéries à Gram-négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* qui font partie des pathogènes classés prioritaires par l'OMS en termes d'antibiorésistance. En raison de son imperméabilité membranaire, *P. aeruginosa* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques, dont la doxycycline. La capacité de la molécule NV716 à créer une sensibilité nouvelle de *P. aeruginosa* à la doxycycline ayant déjà été démontrée, les résultats que j'ai obtenus ont notamment permis de corréler l'activité antibactérienne de la doxycycline à son accumulation intracellulaire chez cette espèce.

Dans une étude complémentaire qui a été publiée pendant ma thèse (voir article dans *Molecules* en fin de manuscrit), nous avons cherché à explorer la perturbation de la membrane externe par NV716 comme moyen de sensibiliser *P. aeruginosa* aux antibiotiques en utilisant une série de dérivés de la tétracycline. En effet, depuis quelques années, les tétracyclines font l'objet d'un intérêt particulier au-delà de leur activité antibiotique. Par exemple, l'utilisation de tétracyclines est associée à une réduction du risque de développer la maladie de Parkinson et de nouveaux dérivés ont été récemment

synthétisés avec des propriétés neuroprotectrices. Pour cela, nous avons étudié comment la perturbation de la membrane externe affectait les règles de perméation et d'activité de 28 tétracyclines chez *P. aeruginosa*. Si des tétracyclines antibiotiques telles que la doxycycline sont relativement peu hydrophobes (coefficient de partage eau/n-octanol, cLogD = - 2,7), les valeurs de CMI des dérivés de la tétracycline initialement décrites comme « non-antibiotiques » mais présentant une valeur de cLogD inférieure ou égale à -1,8 sont soit réduites à un niveau inférieur au seuil de sensibilité de *P. aeruginosa* (CMI < 2 µg/ml), soit potentialisées entre 16 et 128 fois en présence de NV716. À l'inverse, les dérivés de la tétracycline dont la valeur du cLogD est supérieure à -1,8 ne peuvent pas être potentialisés. Ces résultats ont été complétés en utilisant la spectrofluorimétrie pour (i) la mesure l'accumulation de certains dérivés de la tétracycline ; (ii) la mesure de l'inhibition de la traduction dans un système d'expression acellulaire d'*E. coli* avec la GFP comme protéine rapporteur. Ainsi, nous avons conclu que NV716 induisait bien un élargissement significatif la gamme des cLogD compatibles avec l'activité antibactérienne vers des composés plus hydrophobes, modifiant ainsi les règles de perméation moléculaire à travers la membrane externe de *P. aeruginosa*.

J'ai ensuite poursuivi mon travail en caractérisant le mode d'action de NV716. Notamment, nous avons démontré que NV716 agissait en augmentant la perméabilité membranaire suite à son interaction avec le LPS présent à la surface des bactéries. Les expériences de déplacement de la cadavérine comme les tests de sensibilité en présence de LPS exogène sont des essais que l'on pourrait qualifier « d'indirects ». Sur cet aspect, des essais d'interaction directe pourraient être mis en place par exemple en utilisant la microcalométrie, disponible sur la plateforme Interactome sur le site de la Timone à Marseille. Cette approche nous permettrait de tester l'hypothèse selon laquelle la portion polyaminée des composés polyamino-isopréniques de la chimiothèque interagit directement avec les chaines d'acides gras du lipide A. En utilisant des molécules avec les chaines polyaminées de longueur variable et du lipide A pur issu de différentes espèces bactérienne, dont la longueur des chaines d'acides gras est également variable, ces résultats pourraient expliquer les différences d'activités des composés en fonction de l'espèce testée.

Plusieurs approches de microscopie ont ensuite été mises en œuvre afin de caractériser son effet sur la morphologie des bactéries. L'absence de dommages structuraux apparents semble cohérente avec l'absence d'activité antibactérienne de NV716. Ces techniques ont toutefois pu mettre en évidence la création d'un stress chez les bactéries, se traduisant par une surproduction de vésicules membranaires et par la formation de granules de polyphosphates (PolyP) et de polyhydroxyalcanoates (PHA) qu'il sera intéressant de continuer à étudier.

En ce qui concerne la caractérisation des vésicules, les perspectives de travail concernent principalement la caractérisation des protéines contenues ainsi que leur observation par imagerie en haute résolution. Afin de détecter des protéines en SDS-PAGE et des signaux en Western blot, les échantillons de vésicules doivent être concentrés. Pour cela, des plus grands volumes de cultures bactériennes seront préparés et exposés à NV716 dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section « Matériels et Méthodes ». Les protéines totales seront dosées à l'aide de techniques conventionnelles. L'analyse en Western blot est adaptée à la recherche de protéines connues normalement localisées dans les différents compartiments subcellulaires. En particulier, les anticorps dirigés contre OprD de *P. aeruginosa* seront

utilisés. L'analyse SDS-PAGE suivie de la coloration des gels au Bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent, plus sensible, permettra de visualiser les protéines totales contenues dans les vésicules et d'envisager leur identification par spectrométrie de masse.
De nombreuses approches en microscopie sont envisageables pour l'observation et la caractérisation des microvésicules. D'un côté, la microscopie électronique offre une meilleure résolution que la microscopie optique et la littérature rapporte de nombreux clichés de microvésicules bactériennes utilisant cette technique. Aujourd'hui la cryo-EM et cryotomographie électronique (cryo-ET) offrent la possibilité d'observer ces petits objets en deux ou trois dimensions dans des conditions « quasi-natives » qui préservent des structures biologiques complexes. Des projets seront proposés à SOLEIL pour la caractérisation des vésicules de *P. aeruginosa* en réponse à NV716 grâce à l'acquisition et la récente mise en service du cryomicroscope POLARIS. D'un autre côté, la microscopie à fluorescence offre des possibilités uniques de marquage et le suivi de phénomènes dynamiques en temps réel. Dans ce cadre, l'équipe s'est rapproché de Julia Bos, ingénieur de recherche à l'Institut Pasteur, qui a mis au point un dispositif optique permettant d'observer des vésicules d'*E. coli* remarquablement bien résolues à partir de préparations pures (acellulaires) en suspension ou à partir de bactéries immobilisées se développant sur une fine couche d'agarose.[286] Dans ces deux cas, la taille des microvésicules sera préalablement déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS ; *Dynamic Light Scattering*) pour s'assurer de l'homogénéité des préparations.
Quant à la fonction de la libération de vésicules en présence de NV716, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle elles pourraient servir de « pièges moléculaires » pour protéger certains individus au sein d'une population bactérienne exposée. Cette hypothèse pourrait être facilement testée en déterminant la sensibilité aux antibiotiques des bactéries en présence de vésicules pures.
Enfin, sur un aspect plutôt biotechnologique, la production de telles vésicules pourrait être envisagée comme une plateforme pour la caractérisation structurale et fonctionnelle des OMPs dans leur environnement natif.[287] Ceci représenterait un intérêt non-négligeable pour le laboratoire MCT et ses collaborateurs qui étudient la translocation d'antibiotiques à travers les porines de OmpF et OmpC jusqu'ici extraites de la membrane externe d'*E. coli* puis purifiées en présence de détergent avant d'être reconstituées dans des membranes artificielles.[288,289]

De manière inattendue, les analyses en MET-EDX et cryo-SXT nous ont respectivement poussé à nous intéresser à deux molécules encore peu connues : les PolyP et les PHA. A ce jour, les PolyP et les PHA sont principalement décrits comme des molécules de réserves en phosphate inorganique et en carbone produites par les bactéries en réponse à des conditions de stress.
La formation des granules de PolyP est catalysée par l'activité d'une ou de plusieurs polyphosphate kinases qui convertissent l'ATP en PolyP et ADP. La polymérisation est réversible, coordonnée par les mêmes enzymes, et permet de réguler la synthèse du PolyP en fonction de la disponibilité de l'ATP cellulaire. Dans notre étude, les analyses en MET montrent que les dommages en réponse à l'exposition à NV716 sont particulièrement importants lorsque les bactéries dépourvues d'une ou des deux polyphosphate kinases essentielles sont exposées à NV716, ce qui suggère un lien encore inconnu entre la réponse bactérienne au stress membranaire induit par NV716 et la synthèse de PolyP. On pourrait envisager ici de déterminer la quantité d'ATP intracellulaire en lien avec l'exposition des bactéries à NV716, l'expression des polyphosphate kinases et la production ROS puisque plusieurs complexes de la chaîne respiratoire réduisent directement l'oxygène pour générer des ROS ; que l'ATP et les ROS

sont tous deux produits au cours de la respiration. En effet, il a été proposé que les ROS (e.g., l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène) soient à l'origine de l'activité létale d'un large éventail de molécules toxiques, y compris de certains antibiotiques.[290,291] Cependant, cette idée n'est pas facile à vérifier expérimentalement. La courte durée de vie de ces espèces rend difficile leur détection directe et leur quantification *in vivo*, et l'utilisation de marqueurs redox a été vivement critiquée.[292]
En plus des PolyP, les *Pseudomonadales* peuvent accumuler du carbone sous forme de granules de PHA dans les mêmes conditions de stress.[255,293] Les granules de PolyP et des granules de PHA sont observables en MET.[236] Il faudrait donc d'abord utiliser des mutants de *P. aeruginosa* dépourvus des gènes nécessaires à la synthèse de PolyP (Δ*ppk1*, *ppk2a*) ou de PHA (Δ*phaC1*, *phaC2*) cultivés en conditions de stress afin de distinguer clairement les deux types de granules, puis de comparer l'impact de NV716 dans ces deux contextes génétiques.
Les conditions de carence de nutritive induisent une sortie du cycle cellulaire — comme en phase stationnaire de croissance, le nucléoïde ne contient plus qu'une seule origine de réplication ; les cellules ne s'allongent plus mais survivent. Jusqu'à récemment, la guanosine tétraphosphate [(p)ppGpp] était la seule molécule de signalisation connue impliquée de la sortie du cycle cellulaire chez les bactéries. Depuis, deux études indépendantes, ont démontré que les PolyP inhibaient aussi l'initiation de la réplication chez *P. aeruginosa* et *Caulobacter crescentus*.[236,294] Il serait ici intéressant d'analyser une possible sortie de cycle cellulaire chez les bactéries exposées à NV716 pendant plusieurs heures ainsi que l'impact de la synthèse de PolyP sur ce mécanisme.

Plusieurs études ont examiné la relation entre les propriétés physicochimiques des composés et leur accumulation dans les bactéries à Gram négatif. La corrélation initiale entre les propriétés physicochimiques d'un médicament et sa biodisponibilité orale a été proposée par Lipinski et al., établissant cinq règles générales.[295] Cependant, un nombre considérable d'antibiotiques ne respectent pas cette « règle des 5 ». Dans une autre étude, O'Shea et al. ont analysé un ensemble de 147 agents thérapeutiques et ont rapporté que les composés antibactériens occupaient une place distincte. Une analyse plus approfondie a révélé que les antibiotiques présentent aussi des propriétés physicochimiques distinctes avec un poids moléculaire moyen plus faible et une polarité plus élevée pour ceux ciblant les bactéries à Gram-négatif.[296] L'optimisation des paramètres physicochimiques représente un défi important pour l'accumulation des molécules antibactériennes dans les bactéries à Gram-négatif. Bien que ces paramètres soient cruciaux pour améliorer la pénétration des molécules par la voie des porines, ils sont à eux seuls insuffisants pour le développement de molécules à large spectre. En outre, la diversité des molécules de LPS et des protéines de la membrane externe parmi les différentes espèces bactériennes nécessitaient une étude plus complète.
Dans ce contexte, Hergenrother et al. ont étudié l'accumulation de plus de 180 composés chez *E. coli* par spectrométrie de masse afin d'identifier les propriétés physicochimiques communes des composés accumulés.[34] Sur la base de leurs observations, des règles générales d'accumulation, dites « eNTRY », ont été proposées, à savoir la présence d'azote ionisable, une faible tridimensionnalité et une certaine rigidité. Les données d'accumulation ont démontré l'influence de la charge sur l'accumulation des composés dans *E. coli*. Il a notamment été observé que la présence d'une charge positive s'accompagnait d'une meilleure accumulation. Un examen plus approfondi a révélé que les amines primaires jouent un rôle important dans l'accumulation des composés, en particulier par rapport aux amines secondaires, tertiaires ou quaternaires. Cependant, l'amine primaire n'est pas le seul facteur contribuant à l'accumulation, comme le montre

le fait que de nombreux composés contenant des amines primaires testés s'accumulent peu. Par conséquent, d'autres facteurs essentiels ont été étudiés à travers un total de 297 descripteurs moléculaires par le biais d'une analyse computationnelle. En outre, la rigidité (indiquée par un nombre de liaisons rotatives ≤ 5) et la faible tridimensionnalité (quantifiée par un score de globularité calculé ≤ 5) des composés semblent faciliter leur accumulation. Ainsi, des lignes directrices pour l'accumulation des composés dans *E. coli* ont été proposées afin de rationaliser la production d'antibiotiques à large spectre.[34] La même approche a été utilisée chez *P. aeruginosa*. Après avoir mesuré expérimentalement les valeurs d'accumulation individuelles pour 345 composés, les données obtenues ont mis en évidence certaines caractéristiques associées à la charge positive et au nombre de liaisons donneuses d'hydrogène. Plus précisément, les composés ayant une surface polaire positive appropriée (Q_VSA_PPOS ≥ 80) et/ou une charge formelle positive (FC ≥ 0,98) ainsi qu'une surface donneuse de liaisons hydrogène suffisante (HBDSA ≥ 23) ont une forte probabilité de s'accumuler dans cette espèce.[39] Ces règles, appelées ici PASsagE (*Pseudomonas aeruginosa Self-promoted Entry*), n'ont donc rien de général, mais l'analyse est intéressante. Si dans les règles eNTRY définies pour *E. coli*, la présence d'une charge positive favorise la perméation à travers les porines alors que la rigidité et la faible tridimensionnalité réduit l'efflux, il en est tout autrement chez *P. aeruginosa* car l'absence des 40 porines normalement exprimées dans cette espèce n'a aucun impact sur l'accumulation des composés testés. Les composés n'empruntent pas la voie des porines mais se frayent un chemin entre les molécules de LPS à travers la membrane externe. On imagine alors bien comment un composé chimérique entre un antibiotique « non-perméant » et une molécule capable de perturber l'intégrité de la membrane externe s'accumule et devient actif contre *P. aeruginosa*. Dans cette étude, Hergenrother et al. ont synthétisé une chimère entre l'acide fusidique, un antibiotique ciblant spécifiquement les bactéries à Gram-négatif et incapable de s'accumuler chez *P. aeruginosa*, et une polyamine afin de vérifier cette hypothèse.
Il est donc fort probable que NV716 agissent de manière similaire sur l'accumulation de la doxycycline. Ainsi, la synthèse de composés chimériques entre ces deux molécules est actuellement menée par Jean-Michel Brunel au laboratoire MCT. En plus de satisfaire aux règles d'accumulation PASsagE, les chimères sont intéressantes d'un point de vue pharmacocinétique puisque les deux molécules pourraient atteindre ensemble leur cible au foyer infectieux.

Dans le modèle infectieux *G. mellonella*, la probabilité de survie des larves infectées traitées à la doxycycline combinée à NV716 n'est pas statistiquement meilleure en comparaison à la doxycycline seule. Cependant, l'augmentation de la concentration de NV716 pourrait améliorer les taux de survie. Ces résultats ont été complétés par des calculs ADMET effectués via le serveur ADMETlab (https://admetlab3.scbdd.com/) (Fig. 52). Bien que l'interprétation de ces résultats soit encore relativement obscure, plusieurs éléments semblent encourageants. La valeur théorique du logP de 3,659 indique une lipophilie qui se situe dans la fourchette idéale établie. Parallèlement, la valeur TPSA de 62,11 indique que le NV716 est un perméant adéquat des différentes barrières biologiques, présentant une affinité pour les protéines plasmatiques d'environ 65 %, satisfaisant ainsi à la règle de 5 établie par Lipinski. Bien que le NV716 soit un inhibiteur de la glycoprotéine P, le serveur indique qu'il est toujours disponible après absorption intestinale, avec une fraction moléculaire biodisponible de plus de 30 %. En outre, le serveur indique que les activités génotoxiques, cytotoxiques ou hémotoxiques sont faibles, ce qui suggère que le NV716 est un antibiotique sûr et puissant adjuvant au DOX. Néanmoins, l'irritation respiratoire induite par le NV716 devra être réduite pour faciliter

son utilisation par inhalation dans le traitement des infections à *Pseudomonas* chez les patients atteints de mucoviscidose.
Dans ce cadre, il est donc aujourd'hui crucial de tester l'impact de NV716 et des dérivés chimériques avec la doxycycline sur un modèle infectieux approprié comme par exemple sur un modèle *ex vivo* élaboré à partir de cellules pulmonaires humaines.[297]

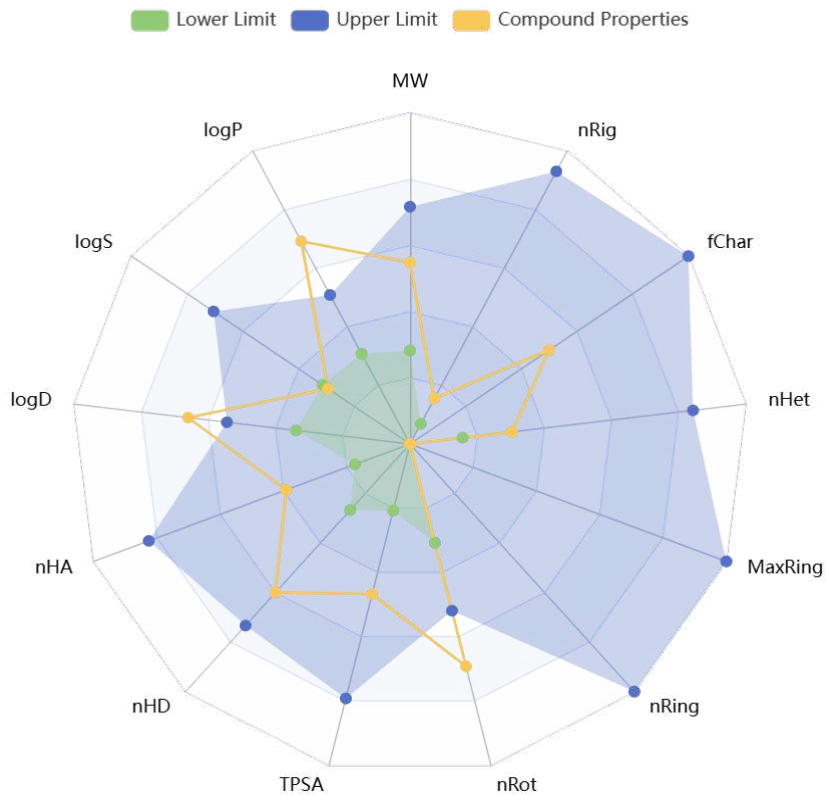


Figure 52 : Analyse ADMET de NV716. Vue en radar : MW, poids moléculaire (optimal : 100-600) ; nRig, nombre de liaisons rigides (optimal : 0-30) ; fChar, charge formelle ; (optimal : 4) ; nHet, nombre d'hétéroatomes (optimal : 1-15) ; MaxRing, nombre d'atomes dans le plus grand anneau (optimal : 0-15) ; nRing, nombre d'anneaux (optimal : 0-6) ; nRot, nombre de liaisons rotatives (optimal : 0-11) ; TPSA, surface polaire topologique (optimal : 0-140) ; nHD, nombre de donneurs d'hydrogène (optimal : 0-7) ; nHA, nombre d'atomes dans le plus grand anneau (optimal : 0-15) : 0-11) ; TPSA, surface polaire topologique (optimale : 0-140) ; nHD, nombre de donneurs d'hydrogène (optimal : 0-7) ; nHA, nombre d'accepteurs d'hydrogène (optimal : 0-12) ; logD, logarithme du coefficient de distribution n-octanol/eau ; logP, coefficient de distribution n-octanol/eau à pH=7,4 ; logS, solubilité dans l'eau.

Pour contourner les barrières à l'accumulation des antibiotiques, il convient de développer des techniques permettant de quantifier cette accumulation. Les approches par fluorimétrie développées au laboratoire MCT et sur la ligne DISCO du synchrotron SOLEIL peuvent être complémentarisées par d'autres techniques permettant d'apporter des informations supplémentaires aux questions posées.

- Le dosage par fluorimétrie est réservé aux molécules possédant des propriétés de fluorescence intrinsèque ou modifiées par un fluorophore. Or, la majorité des antibiotiques ne possèdent pas de telles propriétés. Pour pallier ce problème, le laboratoire MCT développe depuis quelques années une approche en spectrométrie de masse.[289,298]
- L'approche par microscopie à fluorescence UV permet de mesurer l'accumulation des antibiotiques fluorescents dans des bactéries isolées au cours du temps. Jusqu'ici, l'approche « classique » a fourni des résultats importants pour (i) quantifier l'impact de l'efflux sur l'accumulation des fluoroquinolones chez E.

coli ; (ii) l'impact des caractéristiques moléculaires des antibiotiques de cette même famille sur leur capacité à être reconnus et exportés par la pompe AcrAB, majoritaire dans cette espèces.[218,221,299,300] Cependant, cette méthodologie présente deux limitations majeures : (i) le dépôt des bactéries entre deux lamelles de quartz n'empêche pas leur mobilité dans un environnement liquide ; (ii) l'exposition des bactéries à des antibiotiques à distance du microscope ne permet pas l'enregistrement du signal de fluorescence à l'intérieur des bactéries dès le début de l'expérience. Par conséquent et comme je l'ai déjà présenté dans ce manuscrit, cette approche est en cours d'optimisation à l'aide d'un dispositif microfluidique intégré. Dans ce cadre, l'immobilisation des cellules bactériennes constitue un obstacle technique majeur à la mise en œuvre d'approches unicellulaires pour l'imagerie à haute résolution. Le traitement des lamelles par des molécules adhésives est une solution potentielle pour immobiliser les cellules bactériennes et réaliser la microscopie, mais les polymères cationiques traditionnels tels que la PLL affectent profondément la physiologie bactérienne. Pendant ma thèse, nous avons commencé à prototyper un puce avec le laboratoire de microfluidique du synchrotron SOLEIL en nous basant sur des modèles publiés dans la littérature et les premiers résultats obtenus ont été particulièrement prometteurs. Toutefois des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser différentes stratégies chimiques pour leur (bio)compatibilité avec les bactéries immobilisées. Tout d'abord, la fluorescence putative des substrats sera testée dans la gamme d'UV utilisée à DISCO. Ensuite, la survie et l'attachement des bactéries seront évalués. Les bactéries seront observées immédiatement après leur immobilisation et pendant la durée d'une expérience d'accumulation d'antibiotiques (e.g., 30 minutes). La mort cellulaire sera évaluée à l'aide d'une coloration de l'acide nucléique à l'iodure de propidium pour marquer les cellules mortes et à l'aide d'un microscope à fluorescence conventionnel. Des méthodes de suivi seront développées sur DISCO pour étudier l'attachement irréversible (différent du retournement, de la rotation ou du détachement des bactéries) pour les bactéries déposées pendant le flux de liquide (e.g., le flux de tampon de rinçage rapide et le flux d'antibiotique lent) sur les différents substrats. Nous espérons ainsi identifier un substrat qui améliorera le taux de dépôt des bactéries, augmentant ainsi la probabilité qu'une bactérie initialement en mouvement s'immobilise. Des essais d'accumulation seront réalisés avec des souches d'*E. coli* AG100 et AG100A et plusieurs antibiotiques de la famille des fluoroquinolones. Les résultats obtenus seront alors comparés aux résultats précédemment obtenus avec l'approche « classique ».

- Enfin, la résolution limitée de la microscopie UV et l'absence d'étalonnage de la fluorescence ne permettent pas la localisation précise et la quantification intracellulaire des antibiotiques dans les cellules isolées.

L'objectif de la deuxième partie de ma thèse était de démontrer la faisabilité de la méthode employée sur la ligne de lumière ID16A de l'ESRF, à savoir la microscopie à fluorescence X, pour quantifier et localiser l'accumulation d'un antibiotique dans des bactéries isolées. Pour ce faire, un dérivé métallique de la ciprofloxacine a été utilisé. Sa quantification dans des bactéries *E. coli* pourvues ou dépourvues d'efflux a fourni des résultats semblables à ceux obtenus par les techniques de fluorimétrie. L'utilisation de la microscopie à fluorescence X pour quantifier l'accumulation d'un antibiotique a ainsi été validée. Si la localisation de l'antibiotique n'a cependant pas pu être convenablement déterminée en raison de la formation probable de polymères, la technique reste

convaincante pour visualiser la distribution d'un élément dans un échantillon. Ces résultats permettent d'ouvrir la voie à l'étude par microscopie XRF d'antibiotiques métalliques, dont l'intérêt ne cesse de grandir.[301–303]
On peut penser que l'accès restreint à la ligne ID16A, temps d'acquisition sur des cartographies en deux ou trois dimensions ainsi que la durée du traitement des données limitent le nombre de molécules à tester. Ainsi l'approche XRF sur bactéries isolées pourrait être complémentée par une approche sur populations bactériennes en utilisant la spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP OES ; *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) disponible au laboratoire Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) à Marseille. Une expérience « pilote » a été réalisée cet été pour tester l'accumulation de CuCip sur *E. coli* AG100 et AG100A. Bien que l'accumulation du cuivre soit significativement plus importante dans les bactéries exposées à l'antibiotique, aucune différence n'a été observée selon que les bactéries expriment ou non la pompe d'efflux majoritaire AcrAB chez cette espèce. Cependant, cette expérience a été réalisée sur un seul triplicat biologique et mérite d'être reproduite.

Les techniques de microscopie à haute résolution spatiale sont des outils essentiels à l'étude structurelle d'un échantillon biologique. Les approches synchrotron utilisées ont chacune des caractéristiques propres qui permettent d'étudier l'échantillon sous différents aspects. L'observation de cellules vivantes en microscopie à fluorescence UV, ou proches de leur état natif en cryo-SXT et microscopie XRF, offre un avantage non négligeable qu'est l'absence de traitement chimique lors la préparation des échantillons. La préservation des structures et de la composition chimique d'un échantillon est en effet essentielle. La cryomicroscopie électronique qui n'a pas pu être utilisée au cours de ce projet, fait également partie de ces techniques permettant l'étude d'échantillon biologique proche de l'état natif. La complémentarité des approches permet d'améliorer la vue d'ensemble de la structure et de la composition d'un échantillon.
Par ailleurs, les techniques d'imagerie basées sur le rayonnement synchrotron permettent de suivre, quantifier et localiser l'accumulation d'antibiotiques, nécessaire pour comprendre et contourner les mécanismes à l'origine de la diminution de l'accumulation des antibiotiques et surmonter le phénomène de multirésistance aux antibiotiques.

Matériels et Méthodes

Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* sont décrites dans le tableau 5. Sauf indications contraires, les souches ont été cultivées en conditions aérobies dans du milieu de culture Luria Bertani (LB) à 37°C, jusqu'en phase semi-exponentielle (DO_{600} ~ 0,6).

Souche		Caractéristiques	Source
Escherichia coli	AG100	Souche sauvage de référence	MCT
	AG100A	AG100 Δ*acrB*	MCT
	AG100ΔFC	AG100 Δ*ompF,* Δ*ompC*	MCT
	AG100AΔFC	AG100A Δ*ompF,* Δ*ompC*	MCT
	AG100 Gyr	AG100 $GyrA^{S83L,D87N}$	MCT
	AG100A Gyr	AG100A $GyrA^{S83L,D87N}$	MCT
Pseudomonas aeruginosa	PAO1	Souche sauvage de référence	P. Plésiat[304,305]
	PA403	PAO1 Δ*mexAB,* Δ*mexCD,* Δ*mexEF,* Δ*mexXY*	P. Plésiat
	PAS263	PAO1 Δ*pvdF*	I. Schalk[306]
	PW 9413	PAO1 Δ*waaP*	C. Manoil[307]
	PW 9414	PAO1 Δ*waaC*	C. Manoil
	PW 9415	PAO1 Δ*waaF*	C. Manoil
	PA14	Souche sauvage de référence, UCBPP – PA14	D. Newman
	PA14 ΔPolyP	PA14 Δ*ppk1,* Δ*ppk2A*	D. Newman[236]

Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées.

Test de sensibilité aux antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de CIP, CuCip et de DOX ont été déterminées par la méthode standard de dilution en série en milieu liquide dans des microplaques 96 puits (Greiner Bio-One). Les bactéries ont été cultivées en milieu Mueller-Hinton 2 (MH2). Environ 2×10^5 cellules ont été distribuées dans chaque puit contenant des dilutions en série de chaque antibiotique, en l'absence ou en présence de d'autres composés exogènes (NV716, LPS). Après 18h d'incubation à 37°C, la croissance bactérienne a été évaluée par le test de réduction au 2-(4-iodophenyl) -3-(4-nitrophenyl) -5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT). Les valeurs reportées sont des moyennes des expériences réalisées en triplicat.

Accumulation d'antibiotiques pour une mesure dans des lysats bactériens par spectrofluorimétrie

Les tests ont été réalisés comme décrit précédemment.[221] Brièvement, les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle puis collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C). Les culots ont été resuspendus dans du tampon NaPi (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, pH 7,4, 2 mM $MgCl_2$) à une densité finale de 6×10^9 unités formant colonies (UFC) par ml. Un volume de 2,4 ml de la suspension bactérienne a ensuite été incubé en présence ou en absence de l'antibiotique (CIP, CuCip : 5 µM ; DOX : 10 µM) et en présence ou en absence de CCCP, NV716, ou PMB (10 µM) dans un bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. Un volume de 0,8 ml a ensuite été prélevé et déposé sur 1,1 mL de tampon NaPi froid puis immédiatement centrifugé à 10 000 × *g*, 4°C, pendant 5 minutes pour *E. coli* ou 10 minutes pour *P. aeruginosa*.

Lyse et détermination de la concentration intracellulaire en antibiotique par spectrofluorimétrie

Pour la ciprofloxacine et CuCip, les culots bactériens ont été lysés dans 500 µl de solution d'HCl-Glycine (0,1M, pH 3) pendant une nuit à température ambiante. Pour la doxycycline, les culots bactériens ont été resuspendus dans 500 µl de tampon Tris (50 mM pH 8, $MgCl_2$ 2 mM) puis lysés par cycles de congélation en azote liquide et décongélation en bain-marie à 65°C. Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par centrifugation (10 000 × *g*, 10 min, 4°C). 400 µl de chaque lysat ont été mélangés à 600 µl de solution d'HCl-Glycine ou de Tris puis un volume de 100 µ a été déposé dans les puits d'une microplaque demi-puits noirs 96 puits (Greiner Bio-One). Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés par un lecteur de microplaques Spark® TECAN. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont les suivantes : λ_{ex} = 275 nm, λ_{em} = 300-500 nm pour la ciprofloxacine et CuCip ; λ_{ex} = 400 nm, λ_{em} = 450-600 nm pour la doxycycline. Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence maximale de l'antibiotique (CIP, CuCip λ_{em} = 450 nm ; DOX λ_{em} = 520 nm) a été corrigée par celle du tryptophane (λ_{ex} = 275 nm, λ_{em} = 320-350 nm) et le nombre moyen de molécules antibiotiques par bactérie a été déterminé.[221]

Test d'interaction de la doxycycline avec des ribosomes purifiés

Les ribosomes ont été isolés à partir d'une culture d'*E. coli* AG100 selon un protocole décrit précédemment.[223] L'absorbance à 260 nm de la préparation a été mesurée par un appareil NanoDrop puis la concentration a été estimée selon la relation : A_{260} = 1 représente 10 pmoles de ribosomes 70S. Les tests d'interaction ont été réalisés en tampon 20 mM HEPES-KOH pH 7,5 ; 6 mM $MgCl_2$; 30 mM NH_4Cl ; 4 mM β-mercaptoéthanol, avec une concentration constante en doxycycline (D) égale à 10 µM et en faisant varier la concentration en ribosomes (R) de telle manière que les rapports D/R soient égaux à 1/1, 1/5, 1/10. La fluorescence de la doxycycline seule et des mélanges a été mesurée par un lecteur de microplaques Spark® TECAN.

Accumulation de la doxycycline au cours du temps par spectrofluorimétrie

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues dans du tampon NaPi à une DO_{600} de 0,6. Un volume de 10 µl de DOX a été déposé dans les puits à fonds transparents et bords noirs d'une microplaque 96 puits (Greiner Bio-One) de façon à avoir des concentrations finales de 0, 1,25, 2,5, 5, 10, 25, 50, et 100 µM, ainsi que 10 µl de tampon

NaPi avec ou sans NV716 ou PMB à 10 µM final. Pour chaque condition, 180 µl de suspension bactérienne est ajoutée puis la fluorescence de la doxycycline est immédiatement mesurée par le lecteur Spark® TECAN. Une mesure est prise toutes les minutes pendant 30 minutes aux longueurs d'ondes d'excitation λ_{ex} = 400 nm et d'émission λ_{em} = 520 nm. Pour chaque temps, la fluorescence mesurée dans un puit ne contenant que des bactéries est soustraite à celles mesurées pour chaque condition. La valeur de fluorescence mesurée à t=0 est ensuite soustraite aux valeurs de fluorescence mesurées pour chaque temps. Les vitesses initiales d'accumulation de la doxycycline ont été déterminées sur les 5 premières minutes par une analyse par régression linéaire.

Estimation du gain de perméabilité membranaire

Les calculs d'estimation ont été faits en s'affranchissant de l'efflux à partir d'un modèle de diffusion simple basé sur la loi de Fick sur la diffusion moléculaire : $(dC_{in}/dt)\ x\ V = -P\ x\ S\ x\ (C_0 - C_{in}(t))$ avec dC_{in}/dt la variation de la concentration intracellulaire de DOX au cours du temps, V le volume bactérien (µm^3), P la perméabilité membranaire (µm/min), S la surface bactérienne (µm^2), C_0 la concentration extracellulaire de DOX, et C_{in} la concentration intracellulaire de DOX. C_0 étant largement supérieur à C_{in} pendant les premiers temps d'accumulation, la formule peut être simplifiée ainsi : $(dC_{in}/dt)\ x\ V = -P\ x\ S\ x\ C_0$. Ce modèle présume que la fluorescence de DOX est proportionnelle à sa concentration intracellulaire. *E. coli* : S = 2,5 µm^2 ; V = 2,63 µm^3. *P. aeruginosa* : S = 2,5 µm^2 ; V = 2,75 µm^3.[308]

Accumulation par microscopie à fluorescence UV – Méthode classique

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues dans du tampon NaPi à une DO_{600} de 4,8. Des aliquots de 120 µl de suspension bactérienne ont été déposés sur 160 µL de sucrose 1M puis centrifugés (10 000 × *g*, 10 min, 4°C). Les culots ont été gardés dans la glace jusqu'à utilisation. Les bactéries sont ensuite resuspendues dans 40 µl de tampon NaPi avec ou sans antibiotique et avec ou sans NV716. Rapidement, un volume de 0,5 µl de chaque suspension est déposé entre deux lamelles de quartz (ESCO Optics) puis le montage est installé sur la ligne de lumière DISCO du synchrotron SOLEIL, sous le microscope inversé plein champ Zeiss Axio Observer Z-1 équipé d'un objectif 100X Ultrafluar Zeiss et compatible avec les rayons UV profond. Une fois la mise au point des bactéries d'une région d'intérêt faite en lumière visible, la fluorescence est enregistrée sur 30 minutes avec une acquisition de 30s toutes les 2 minutes. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 275 nm et réfléchi par un miroir dichroïque à 310 nm (FF310-Di01-25x36 SEMROCK, USA). Deux filtres passe-bande permettent de détecter l'émission de fluorescence de la ciprofloxacine entre 420 et 480 nm (OMEGA QMAX 420-480/0607) et du tryptophane entre 327 et 353 nm (SEMROCK FF01-340/26). Les signaux de fluorescence de la ciprofloxacine et du tryptophane sont enregistrés successivement après 30 secondes d'exposition chacun. Les images en lumière visible sont enregistrées après 100 millisecondes d'exposition. Les images sont collectées par une caméra EMCDD (*electron-multiplying charge-coupled device*) sensible aux UV (ANDOR iKon-M 934-BU). L'ensemble de l'installation est contrôlé par le logiciel Micro-Manager.[309] Les images ont été analysées par un ensemble de scripts Python développés sur la ligne de lumière DISCO (https://gitlab.synchrotron-soleil.fr/disco-beamline/bacteria-drug-uv-analysis) pour analyser l'accumulation de l'antibiotique au cours du temps dans chaque bactérie. Les intensités de fluorescence ont été calculées comme précédemment décrit.[221]

Fabrication d'un dispositif de microfluidique

Un patron du motif du canal a été fait sur une plaque de silicone avec de la résine (SU-8 2050 Microchem™) et gravé avec le système de lithographie Dilase 250. Le canal principal fait 0,6 mm de large, 7 mm de long et 100 µm d'épaisseur. Le silicone polydimethylsiloxane (PDMS) (Sylgard™ 184) a été mélangé à un agent polymérisant (1 :10), puis le mélange a été dégazé, coulé sur la plaque possédant le motif, et séché à 75°C sur la nuit. Les puces ont ensuite été détaillées dans le PDMS et perforées au niveau des entrées et de la sortie du canal avec un système de piston de 0,35 mm de diamètre (EMS rapid-core). Les puces de microfluidique ont finalement été collées par traitement au plasma sur des lamelles de quartz précédemment recouvertes par de l'APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) dilué dans 3 % d'éthanol par immersion pendant 1h.

Accumulation par microscopie à fluorescence UV – Microfluidique

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues dans du tampon NaPi à une DO_{600} de 1. La suspension bactérienne a été injectée par un des deux canaux d'entrée de la puce microfluidique et les bactéries ont été laissées sédimenter pendant 10 minutes. Les bactéries non fixées ont ensuite été éliminées par injection de tampon NaPi à travers le même canal d'entrée. Une fois la puce positionnée sous le microscope inversé plein champ de la ligne de lumière DISCO (Zeiss Axio Observer Z-1 ; objectif 100X Ultrafluar Zeiss), un premier canal d'entrée a été relié à un réservoir de tampon NaPi, tandis que le deuxième a été relié à un réservoir d'antibiotique avec ou sans NV716. Les flux des deux solutions injectées sont gérés par un contrôleur de pression (OB1 MK4 from ELVESYS). Le flux entrant dans le canal du tampon NaPi a été fixé à 20 µl/min, et à 1 µl/min dans le canal de l'antibiotique. Deux régions d'intérêt ont été déterminées en lumière visible avant de commencer l'acquisition sur une durée totale de 30 minutes, avec une mesure toutes les minutes pour la doxycycline ou toutes les deux minutes pour la ciprofloxacine. L'inversion des deux flux (e.g., tampon vs antibiotique) est opérée après le deuxième temps d'acquisition. Pour la ciprofloxacine, les réglages du microscope (miroir et filtres) et les temps d'exposition sont les mêmes qu'en méthode classique. Pour la doxycycline, d'autres filtres passe-bande ont permis de sélectionner des plages de longueurs d'ondes d'excitation entre 320 et 380 nm et d'émission entre 480 et 550 nm. Les signaux de fluorescence de la doxycycline ont été enregistré après 5 secondes d'exposition. Les images en lumière visible ont été enregistrée après 100 millisecondes d'exposition. Les images ont été collectée par une caméra EMCDD (*electron-multiplying charge-coupled device*) sensible aux UV (ANDOR iKon-M 934-BU). L'ensemble de l'installation est contrôlé par le logiciel Micro-Manager.[309] Les images ont été analysées par un ensemble de scripts Python développés sur la ligne de lumière DISCO (https://gitlab.synchrotron-soleil.fr/disco-beamline/bacteria-drug-uv-analysis) pour analyser l'accumulation de l'antibiotique au cours du temps dans chaque bactérie. Les bactéries ont été segmentées à chaque pas de temps à l'aide de l'algorithme StarDist[310] entraîné sur des images d'accumulation d'antibiotiques acquises sur la ligne de lumière DISCO. Les bactéries segmentées ont ensuite été suivies avec la procédure de suivi STracking (https://github.com/sylvainprigent/stracking) puis l'intensité de fluorescence moyenne a été déterminée.

Test de déplacement de la BODIPY-Cadavérine

Ce test a été réalisé comme décrit précédemment[228] pour quantifier les affinités de liaison de NV716, de la PMB, et du chloramphénicol (CHL) à du LPS purifié de *P. aeruginosa* (L9143, Sigma-Aldrich) et de *E. coli* (L2880, Sigma-Aldrich). La fluorescence de la BODIPY-Cadavérine (BC) est éteinte lorsqu'elle est liée au LPS. Son déplacement pas des composés interagissant avec le LPS restaure sa fluorescence. Des solutions de NV716, PMB, et CHL ont été préparées 2X et diluées en série dans du tampon NaPi. 50 µl de chacune des dilutions ont été déposés dans les puits d'une microplaque demi-puits noirs 96 puits (Greiner Bio-One). Après incubation 15 minutes à l'obscurité de la BC à 10 µM mélangée à 200 µg/ml de LPS, un volume de 50 µl de solution BC-LPS a été ajouté dans chacun des puits. La fluorescence de la BC est mesurée par le lecteur Spark® TECAN après 30 minutes d'incubation à l'obscurité. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont λ_{ex} = 580 nm, λ_{em} = 620 nm.

Microscopie à fluorescence

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,6 dans du tampon NaPi en présence ou en absence de NV716 (10 µM) ou de PMB (1 µM). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les bactéries sont centrifugées (10 000 x g, 5 min, 4°C) puis resuspendues dans 500 µl de FM4-64 à 5 µg/ml (T13320, Thermo Fisher Scientific) et incubées à l'obscurité à 4°C pendant 5 minutes. Les bactéries sont ensuite centrifugées (10 000 x g, 5 min, 4°C), lavées, puis resuspendues dans du tampon NaPi. Les vésicules bactériennes isolées (voir ci-dessous) ont été marquées au FM4-64 de la même manière que les bactéries, ainsi qu'au Hoechst 33342 (1 µg/ml). 2 µl de suspension bactérienne ou de vésicules ont été déposés entre deux lamelles puis observés sous un microscope à fluorescence inversé (OLYMPUS IX83) avec un objectif Olympus 100X. Des images ont été acquises en lumière visible et en fluorescence à l'aide d'un cube mCherry (λ_{ex} = 542-582 nm ; Dm = 593 nm ; λ_{em} = 603-678 nm) et d'un cube DAPI (λ_{ex} = 352-402 nm ; dm = 400 nm ; λ_{em} = 417-477 nm) pour détecter la fluorescence du FM4-64 et du Hoechst respectivement. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

Microscopie électronique à transmission

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,6 dans du tampon NaPi en présence ou en absence de NV716 (10 µM). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les bactéries sont centrifugées (10 000 x g, 5 min, 4°C) puis fixées avec 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH 7.4, 2% sucrose ; Merck Millipore) sur la nuit à 4°C. Après lavage, une deuxième étape de fixation avec 1 % (v/v) de tétroxyde d'osmium dans un tampon cacodylate est réalisée pendant 1h à température ambiante sous hotte chimique et couvert d'une feuille d'aluminium. Les échantillons sont ensuite marqués avec 2 % (v/v) d'acétate d'uranyle pendant 1h à 4°C, déshydratés à différentes concentrations d'éthanol, puis enrobés dans une résine Epon LX112 (Inland Europe). Après 48h de polymérisation à 60°C, des coupes ultraminces (120 nm) des échantillons sont faites avec un ultramicrotome Reichert Ultracut S (Leica Microsystems) puis déposées sur des grilles en cuivre. Les coupes sont ensuite doublement marquées avec 2 % d'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, une technique standard en microscopie électronique pour augmenter les contrastes. Les images ont été acquises avec un microscope CM10 opérant à 100 keV et équipé d'une

caméra CCD (*charge-coupled device*) Erlanghsen 1000 Gatan. Aucun filtre n'a été appliqué aux images. Les expériences ont été réalisées sur la plateforme de microscopie de l'IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées) situé à Bretigny-sur-Orge.

Microscopie électronique à transmission en mode balayage et spectroscopie EDX

Les bactéries PAO1 ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,6 dans du tampon NaPi en présence ou en absence de NV716 (10 µM). Les bactéries PA14 ont été préparées à l'identique mais cultivées dans un milieu minimum Gutnick (10 mM NH_4Cl, 77,5 mM K_2HPO_4, 33,8 mM KH_2PO_4, 5,74 mM K_2SO_4, 0,41 mM $MgSO_4$, 0,4 % (w/v) glucose). Pour les expériences de carence en azote, la concentration de NH_4Cl est de 3 mM. Les échantillons ont été préparés comme décrit précédemment en MET. Les analyses de STEM-EDX ont été réalisées sur un microscope Titan Themis 300 G3 (Thermo Fisher Scientific) équipé d'un canon à électron X-FEG et opéré à 300 keV. Les images de MET ont été acquises à l'aide d'une caméra FEI CMOS Ceta 16M. Des détecteurs HAADF (*high-angle annular dark-field*) et BF (*bright-field*) ont été utilisés pour l'acquisition des images de STEM. Les spectres EDX des régions d'intérêts ont été enregistrés à l'aide d'un détecteur SDD (*silicon drift detector*) (X-Max 80T, Oxford Instruments) et analysés à l'aide du logiciel AZtec (Oxford Instruments). Les expériences ont été faites au Centre Interdisciplinaire de Microscopie Électronique (CIMEX) de l'École Polytechnique à Paris.

Cryo-tomographie aux rayons X (SXT)

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase semi-exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,6 dans du tampon NaPi en présence ou en absence de NV716 (10 µM). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les bactéries sont centrifugées (10 000 x g, 5 min, 4°C) et resuspendues dans du tampon NaPi. 2 µl de suspension bactérienne ont été déposés sur la face carbone de grilles Quantifoil® Finder grids R2/2 (Au G200F1, Quantifoil Micro Tools) précédemment traitées au plasma. 2 µl de billes de 100 nm de diamètre (GC100, BBI solutions) ont ensuite été déposés sur les 2 µl de suspension bactérienne. L'excès de liquide sur les grilles a été absorbé en appliquant le coté en or de la grille contre un papier buvard puis la grille a été plongée dans de l'éthane liquide à l'aide d'un appareil de cryo-plonge Leica EM GP2. Les échantillons vitrifiés ont ensuite été transférés dans une boîte cryogénique et conservés dans de l'azote liquide. Les expériences ont été réalisées sur la ligne de lumière MISTRAL au synchrotron ALBA.[241,242] Le faisceau incident, fixé à 520 eV est focalisé avec un condenseur mono-capillaire et une zone plate de 25 nm a été utilisée comme objectif de collection, permettant d'obtenir une projection d'image plein champ en transmission sur la caméra CCD avec une taille de pixel de 10 nm de résolution. Une série d'inclinaisons de la grille a été réalisée, avec des projections recueillies de -65° à +65° à un pas angulaire de 1° et un temps d'exposition de 2 secondes pour chaque projection.[311] Les séries d'inclinaison ont d'abord été normalisées par le flux entrant puis déconvoluées avec un filtre Wiener en utilisant la fonction de dispersion des points du système optique.[312] Ces séries d'inclinaison ont été alignées à l'aide d'une technique de patch-tracking utilisant AreTomo[313] et IMOD[314]. Les séries d'inclinaison alignées ont ensuite été reconstruites à l'aide de l'algorithme SIRT (*Simultaneous Iterative Reconstruction technique*) implémenté dans le logiciel Tomo3D[315] avec un paramètre d'itération de 40. Également, deux images à un angle de 0° ont été prises avant et après l'acquisition des séries d'inclinaison pour s'assurer que l'échantillon n'a pas été endommagé par le faisceau de rayons X.

Isolement et quantification de vésicules bactériennes

Des cultures sur la nuit ont été utilisées pour inoculer 500 ml de milieu LB à une dilution de 1:50, qui ont été cultivées à 37°C jusqu'en phase semi-exponentielle. Les bactéries ont été collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,4 dans du milieu LB frais en présence ou en absence de NV716 (10 µM). Les cultures ont ensuite été cultivées jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,9-1,1. Un aliquot de chaque culture a été déposé sur boîte LB agar afin de déterminer la viabilité bactérienne, exprimée en CFU/ml. Après centrifugation (10 000 × *g*, 10 min) des cultures, les surnageants ont été filtrés avec des filtres 0,45 µm composés d'une membrane de polyethersulfone (Thermo Fisher Scientific). Les vésicules en suspension ont ensuite été collectées par centrifugation (38 000 × *g*, 1h, 4°C), lavées dans du tampon HEPES (50 mM, pH 6,8) puis filtrées une seconde fois. Les échantillons ont ensuite été concentrés par ultracentrifugation (120 000 x g, 1h) et resuspendus dans 100 µl de tampon HEPES. Les vésicules ont été marquées au FM4-64, déposées dans une microplaque demi-puits noirs 96 puits, puis la fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 515 nm et d'émission de 640 nm à l'aide d'un lecteur Spark® TECAN. Le nombre de URF/mL obtenu a été divisé par le nombre de UFC/mL. Le rapport URF/UFC de la préparation de vésicules provenant de la culture traitée au NV716 a été divisée par celui de la culture non traitée afin de déterminer le facteur d'induction de vésicules par NV716.

Analyse de la présence de LPS par dot-blot

Des aliquots de vésicules bactériennes ont été préparés comme décrit ci-dessus puis ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose placée dans un appareil dot-blot (Bio-Rad). La membrane a ensuite été incubée dans une solution d'anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre le lipide A (Thermo Fisher Scientific) dilués à 1:5000. Des anticorps secondaires de lapin anti-chèvre conjugués à la péroxydase alcaline (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés pour détecter par chimioluminescence la présence de lipide A à la surface des vésicules.

Modèle d'infection *Galleria mellonella*

Les chenilles de *Galleria mellonella* (achetées à l'INRAE de Jouy-en-Josas) ont été réparties aléatoirement en groupes de 20 individus. Après infection ou non des chenilles par la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (10 µl, 25 UFC) un traitement constitué de tampon NaPi, avec ou sans DOX (50 mg/Kg), avec ou sans NV716 (5 µM) leur a été injecté. La survie des chenilles a été suivie sur 3 jours. Les expériences ont été réalisées deux fois.

Microscopie à fluorescence aux rayons X (XRF)

Les bactéries ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle, collectées par centrifugation (5000 × *g*, 15 min, 21°C) puis resuspendues à une DO_{600} de 0,6 dans du tampon NaPi en présence ou en absence de NV716-Cu (10 µM) ou de CuCip (5 µM). Après 15 minutes (CuCip) ou 30 minutes (NV716-Cu) d'incubation à 37°C, les bactéries sont centrifugées (10 000 x g, 5 min, 4°C) et resuspendues dans du tampon NaPi. Pour chaque condition, 2 µl de suspension bactérienne est déposé sur une membrane de nitrure de silicium (Silson Ltd, England) d'une taille de 1,5 mm x 1,5 mm et d'une épaisseur de 500 nm. L'excès de tampon sur les membranes est absorbé par un papier buvard puis la membrane est plongée dans de l'éthane liquide à l'aide d'un appareil de cryo-plonge Leica EM GP2. Les échantillons vitrifiés ont ensuite été transférés dans une boîte

cryogénique et conservés dans de l'azote liquide. Les expériences ont été réalisées en conditions cryogéniques à ~ $1e^{-7}$ mbar (vide) sur la ligne de lumière ID16A de l'ESRF.[316] L'énergie d'excitation des rayons X a été fixée à 17 keV et tous les éléments pertinents (P, S, Ca, Zn, Fe, Cu) ont été détectés à l'aide de leurs lignes d'émission de niveau K (1ère couche électronique). Un système de miroir de focalisation Kirkpatrick-Baez (KB) à courbure fixe et à revêtement multicouche assure la nano-focalisation (~ 30 nm) et un flux de $4,1\times10^{11}$ ph/s.[317] Les mesures ont été effectuées avec un pas de 20 nm/pixel ou 40 nm/pixel et un temps d'intégration de 50 ms/pixel. Le signal XRF a été enregistré avec deux détecteurs à angle larges solides, et placés à environ 90° de part et d'autre du faisceau incident.

Quantification des éléments par microscopie à fluorescence aux rayons X (XRF)

Les cartographies XRF en deux dimensions enregistrées ont ensuite été converties en densité de masse (ng/mm^2) dans les figures à l'aide du logiciel libre PyMCA.[318,319] La calibration absolue de la densité de masse surfacique des éléments (ng/mm^2) a été déterminé à l'aide d'un standard à couche mince (AXO Dresden GmbH). Pour extraire la quantité totale d'un élément par bactérie, la carte de la densité de masse surfacique (ng/mm^2) a été traitée comme décrit ci-après. Le contour des bactéries a été délimité manuellement à l'aide du logiciel ImageJ sur la carte de densité surfacique de l'élément phosphore. L'intensité moyenne des pixels à l'intérieur de ce contour a été calculée sur les cartes de densité de masse surfacique des éléments phosphore et cuivre. De cette intensité moyenne a été soustraite la valeur moyenne de fond, estimée comme la moyenne à l'intérieur d'une zone sans bactéries sur la même carte de densité de masse de la zone. La quantité totale de phosphore et de cuivre dans les bactéries (en ng) a finalement été obtenue en multipliant cette intensité moyenne corrigée du bruit de fond, par la surface des bactéries convertie en millimètres carrés. La quantité totale de cuivre a été convertie en nombre de molécules par bactérie en utilisant la masse molaire du cuivre (63,5 g/mol).

Tomographie de fluorescence aux rayons X

Pour obtenir la localisation en 3D des éléments phosphore et cuivre, des séries d'inclinaison par projection angulaire ont été acquises de -78° à +78° à un pas angulaire de 6° et un pas de 40 nm. Comme décrit précédemment, les cartes enregistrées pour chaque angle d'inclinaison ont été ajustées à l'aide du logiciel PyMCA. Une version légèrement modifiée de l'algorithme d'itération reconstructif joint[320] a été utilisée pour aligner les séries d'inclinaison des éléments phosphore et cuivre. Ces séries d'inclinaison alignées ont ensuite été reconstruites à l'aide de l'algorithme ART (Algebraic Reconstruction Technique) avec contrainte non négative de la boîte à outils ASTRA[321] implémentée dans le programme python TomoPy[322] pour obtenir des tomogrammes de phosphate et de cuivre. La segmentation 3D et le rendu des tomographies ont été réalisés avec ChimeraX.[323] Un filtre gaussien pour lisser les surfaces a été appliqué avec un écart type de 3Å et 1,5Å respectivement pour le phosphore et le cuivre.

Références bibliographiques

1. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12). (Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Murray, C. J. L. *et al*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
4. Darby, E. M. *et al*. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol* **21**, 280–295 (2023).
5. De Pascale, G. & Wright, G. D. Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem* **11**, 1325–1334 (2010).
6. Lambert, P. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1471–1485 (2005).
7. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a000414–a000414 (2010).
8. Vergalli, J. *et al*. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **18**, 164–176 (2020).
9. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593–656 (2003).
10. Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002).
11. Cullis, P. R., Fenske, D. B. & Hope, M. J. Physical properties and functional roles of lipids in membranes.
12. Kim, S. *et al*. Bilayer Properties of Lipid A from Various Gram-Negative Bacteria. *Biophysical Journal* **111**, 1750–1760 (2016).
13. Wang, L., Wang, Q. & Reeves, P. R. The Variation of O Antigens in Gram-Negative Bacteria. in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition* (eds. Wang, X. & Quinn, P. J.) vol. 53 123–152 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2010).
14. Delcour, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**, 808–816 (2009).
15. Olaitan, A. O., Morand, S. & Rolain, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
16. Acosta-Gutiérrez, S. *et al*. Getting Drugs into Gram-Negative Bacteria: Rational Rules for Permeation through General Porins. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1487–1498 (2018).
17. Nikaido, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. *Science* **264**, 382–388 (1994).
18. Chevalier, S. *et al*. Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins. *FEMS Microbiology Reviews* **41**, 698–722 (2017).
19. Shadan, A., Pathak, A., Ma, Y., Pathania, R. & Singh, R. P. Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to Acinetobacter baumannii infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, 1053968 (2023).
20. Sugawara, E. & Nikaido, H. OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of Acinetobacter baumannii. *J Bacteriol* **194**, 4089–4096 (2012).
21. Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M. & Nikaido, H. Pseudomonas aeruginosa Porin OprF Exists in Two Different Conformations. *Journal of Biological*

Chemistry **281**, 16220–16229 (2006).
22. Park, J. S. *et al.* Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB j.* **26**, 219–228 (2012).
23. Yamaguchi, A., Nakashima, R. & Sakurai, K. Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
24. Li, X.-Z. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. (2009).
25. Poole, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine* **39**, 162–176 (2007).
26. Li, X.-Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**, 337–418 (2015).
27. Masuda, N. *et al.* Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3322–3327 (2000).
28. Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F. & Faoro, H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa. *IJMS* **23**, 15779 (2022).
29. Zgurskaya, H. I., Rybenkov, V. V., Krishnamoorthy, G. & Leus, I. V. Trans-envelope multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria and their synergism with the outer membrane barrier. *Research in Microbiology* **169**, 351–356 (2018).
30. Lomovskaya, O. *et al.* Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 105–116 (2001).
31. Wilhelm, J. & Pos, K. M. Molecular insights into the determinants of substrate specificity and efflux inhibition of the RND efflux pumps AcrB and AdeB. *Microbiology* **170**, (2024).
32. Plé, C. *et al.* Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat Commun* **13**, 115 (2022).
33. Vieira Da Cruz, A. *et al.* Pyridylpiperazine efflux pump inhibitor boosts in vivo antibiotic efficacy against K. pneumoniae. *EMBO Mol Med* **16**, 93–111 (2023).
34. Richter, M. F. *et al.* Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. *Nature* **545**, 299–304 (2017).
35. Cooper, C. J. *et al.* Molecular Properties That Define the Activities of Antibiotics in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1223–1234 (2018).
36. Richter, M. F. & Hergenrother, P. J. The challenge of converting Gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1435**, 18–38 (2019).
37. Zhao, S. Defining new chemical space for drug penetration into Gram-negative bacteria. *Nature Chemical Biology* **16**, (2020).
38. Haloi, N. *et al.* Rationalizing the generation of broad spectrum antibiotics with the addition of a positive charge. *Chem. Sci.* **12**, 15028–15044 (2021).
39. Geddes, E. J. *et al.* Porin-independent accumulation in Pseudomonas enables antibiotic discovery. *Nature* **624**, 145–153 (2023).
40. Cain, B. N. & Hergenrother, P. J. Using permeation guidelines to design new antibiotics—A PASsagE into *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical & Translational Med* **14**, e1600 (2024).
41. Wu, T. *et al.* Identification of a Multicomponent Complex Required for Outer Membrane Biogenesis in Escherichia coli. *Cell* **121**, 235–245 (2005).
42. Malinverni, J. C. *et al.* YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **61**, 151–164 (2006).

43. Mori, H. & Ito, K. The Sec protein-translocation pathway. *Trends in Microbiology* **9**, 494–500 (2001).
44. Mogensen, J. E. & Otzen, D. E. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Molecular Microbiology* **57**, 326–346 (2005).
45. Noinaj, N., Kuszak, A. J., Balusek, C., Gumbart, J. C. & Buchanan, S. K. Lateral Opening and Exit Pore Formation Are Required for BamA Function. *Structure* **22**, 1055–1062 (2014).
46. Iadanza, M. G. *et al*. Lateral opening in the intact β-barrel assembly machinery captured by cryo-EM. *Nat Commun* **7**, 12865 (2016).
47. Doerner, P. A. & Sousa, M. C. Extreme Dynamics in the BamA β-Barrel Seam. *Biochemistry* **56**, 3142–3149 (2017).
48. Robert, V. *et al*. Assembly Factor Omp85 Recognizes Its Outer Membrane Protein Substrates by a Species-Specific C-Terminal Motif. *PLoS Biol* **4**, e377 (2006).
49. Wang, X., Peterson, J. H. & Bernstein, H. D. Bacterial Outer Membrane Proteins Are Targeted to the Bam Complex by Two Parallel Mechanisms. *mBio* **12**, e00597-21 (2021).
50. Albrecht, R. & Zeth, K. Structural Basis of Outer Membrane Protein Biogenesis in Bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 27792–27803 (2011).
51. Tomasek, D. *et al*. Structure of a nascent membrane protein as it folds on the BAM complex. *Nature* **583**, 473–478 (2020).
52. Xiao, L. *et al*. Structures of the β-barrel assembly machine recognizing outer membrane protein substrates. *The FASEB Journal* **35**, e21207 (2021).
53. Doyle, M. T. *et al*. Cryo-EM structures reveal multiple stages of bacterial outer membrane protein folding. *Cell* **185**, 1143-1156.e13 (2022).
54. Shen, C. *et al*. Structural basis of BAM-mediated outer membrane β-barrel protein assembly. *Nature* **617**, 185–193 (2023).
55. Hart, E. M. *et al*. A small-molecule inhibitor of BamA impervious to efflux and the outer membrane permeability barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 21748–21757 (2019).
56. Wade, N. *et al*. Synthesis and Structure–Activity Studies of β-Barrel Assembly Machine Complex Inhibitor MRL-494. *ACS Infect. Dis.* **8**, 2242–2252 (2022).
57. Steenhuis, M. *et al*. Inhibition of autotransporter biogenesis by small molecules. *Molecular Microbiology* **112**, 81–98 (2019).
58. Jain, S. & Goldberg, M. B. Requirement for YaeT in the Outer Membrane Assembly of Autotransporter Proteins. *J Bacteriol* **189**, 5393–5398 (2007).
59. Kim, S. *et al*. Structure and Function of an Essential Component of the Outer Membrane Protein Assembly Machine. *Science* **317**, 961–964 (2007).
60. Hagan, C. L., Wzorek, J. S. & Kahne, D. Inhibition of the β-barrel assembly machine by a peptide that binds BamD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 2011–2016 (2015).
61. Mori, N. *et al*. A peptide based on homologous sequences of the -barrel assembly machinery component BamD potentiates antibiotic susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**, 2173–2181 (2012).
62. Li, Y. *et al*. Identification of a Compound That Inhibits the Growth of Gram-Negative Bacteria by Blocking BamA–BamD Interaction. *Front. Microbiol.* **11**, 1252 (2020).
63. Storek, K. M. *et al*. Monoclonal antibody targeting the β-barrel assembly machine of *Escherichia coli* is bactericidal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, 3692–3697 (2018).
64. Kaur, H. *et al*. Identification of conformation-selective nanobodies against the membrane protein insertase BamA by an integrated structural biology approach. *J Biomol NMR* **73**, 375–384 (2019).
65. White, P. *et al*. The role of membrane destabilisation and protein dynamics in BAM catalysed OMP folding. *Nat Commun* **12**, 4174 (2021).

66. Imai, Y. *et al.* A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature* **576**, 459–464 (2019).
67. Kaur, H. *et al.* The antibiotic darobactin mimics a β-strand to inhibit outer membrane insertase. *Nature* **593**, 125–129 (2021).
68. Wuisan, Z. G., Kresna, I. D. M., Böhringer, N., Lewis, K. & Schäberle, T. F. Optimization of heterologous Darobactin A expression and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Metabolic Engineering* **66**, 123–136 (2021).
69. Groß, S. *et al.* Improved broad-spectrum antibiotics against Gram-negative pathogens *via* darobactin biosynthetic pathway engineering. *Chem. Sci.* **12**, 11882–11893 (2021).
70. Böhringer, N. *et al.* Mutasynthetic Production and Antimicrobial Characterization of Darobactin Analogs. *Microbiol Spectr* **9**, e01535-21 (2021).
71. Seyfert, C. E. *et al.* Darobactins Exhibiting Superior Antibiotic Activity by Cryo-EM Structure Guided Biosynthetic Engineering**. *Angew Chem Int Ed* **62**, e202214094 (2023).
72. Guo, S. *et al.* Radical SAM-dependent ether crosslink in daropeptide biosynthesis. *Nat Commun* **13**, 2361 (2022).
73. Ma, S. *et al.* Substrate-Controlled Catalysis in the Ether Cross-Link-Forming Radical SAM Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 22945–22953 (2023).
74. Miller, R. D. *et al.* Computational identification of a systemic antibiotic for Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol* **7**, 1661–1672 (2022).
75. Zhou, Z., White, K. A., Polissi, A., Georgopoulos, C. & Raetz, C. R. H. Function of Escherichia coli MsbA, an Essential ABC Family Transporter, in Lipid A and Phospholipid Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 12466–12475 (1998).
76. Sperandeo, P., Martorana, A. M. & Polissi, A. The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 17981–17990 (2017).
77. Narita, S. & Tokuda, H. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Letters* **583**, 2160–2164 (2009).
78. Owens, T. W. *et al.* Structural basis of unidirectional export of lipopolysaccharide to the cell surface. *Nature* **567**, 550–553 (2019).
79. Li, Y., Orlando, B. J. & Liao, M. Structural basis of lipopolysaccharide extraction by the LptB2FGC complex. *Nature* **567**, 486–490 (2019).
80. Tang, X. *et al.* Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB2FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism. *Nat Commun* **10**, 4175 (2019).
81. Wilson, A. & Ruiz, N. The transmembrane α-helix of LptC participates in LPS extraction by the $LptB_2FGC$ transporter. *Molecular Microbiology* **118**, 61–76 (2022).
82. Villa, R. *et al.* The Escherichia coli Lpt Transenvelope Protein Complex for Lipopolysaccharide Export Is Assembled via Conserved Structurally Homologous Domains. *Journal of Bacteriology* **195**, 1100–1108 (2013).
83. Gómez Borrego, J. & Torrent Burgas, M. Structural assembly of the bacterial essential interactome. *eLife* **13**, e94919 (2024).
84. Freinkman, E., Chng, S.-S. & Kahne, D. The complex that inserts lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane forms a two-protein plug-and-barrel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2486–2491 (2011).
85. Dong, H. *et al.* Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* **511**, 52–56 (2014).
86. Qiao, S., Luo, Q., Zhao, Y., Zhang, X. C. & Huang, Y. Structural basis for

lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature* **511**, 108–111 (2014).
87. Malojčić, G. *et al.* LptE binds to and alters the physical state of LPS to catalyze its assembly at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 9467–9472 (2014).
88. Titecat, M. *et al.* High susceptibility of MDR and XDR Gram-negative pathogens to biphenyl-diacetylene-based difluoromethyl- *allo* -threonyl-hydroxamate LpxC inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2874–2882 (2016).
89. Lemaître, N. *et al.* Curative Treatment of Severe Gram-Negative Bacterial Infections by a New Class of Antibiotics Targeting LpxC. *mBio* **8**, e00674-17 (2017).
90. Krause, K. M. *et al.* Potent LpxC Inhibitors with *In Vitro* Activity against Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, e00977-19 (2019).
91. Zhou, P. & Hong, J. Structure- and Ligand-Dynamics-Based Design of Novel Antibiotics Targeting Lipid A Enzymes LpxC and LpxH in Gram-Negative Bacteria. *Acc. Chem. Res.* **54**, 1623–1634 (2021).
92. Zhao, J. *et al.* Preclinical safety and efficacy characterization of an LpxC inhibitor against Gram-negative pathogens. *Sci. Transl. Med.* **15**, eadf5668 (2023).
93. Ho, H. *et al.* Structural basis for dual-mode inhibition of the ABC transporter MsbA. *Nature* **557**, 196–201 (2018).
94. Alexander, M. K. *et al.* Disrupting Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Biosynthesis through Inhibition of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, e01142-18 (2018).
95. Verma, V. A. *et al.* Discovery of Inhibitors of the Lipopolysaccharide Transporter MsbA: From a Screening Hit to Potent Wild-Type Gram-Negative Activity. *J. Med. Chem.* **65**, 4085–4120 (2022).
96. Pei, S. *et al.* Discovery of novel tetrahydrobenzothiophene derivatives as MSBA inhibitors for antimicrobial agents. *Bioorganic Chemistry* **142**, 106932 (2024).
97. Steinberg, D. A. *et al.* Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1738–1742 (1997).
98. Chen, J. *et al.* Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: Structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* **55**, 88–98 (2000).
99. Shankaramma, S. C. *et al.* Macrocyclic Hairpin Mimetics of the Cationic Antimicrobial Peptide Protegrin I: A New Family of Broad-Spectrum Antibiotics. *ChemBioChem* **3**, 1126–1133 (2002).
100. Robinson, J. A. *et al.* Properties and structure–activity studies of cyclic β-hairpin peptidomimetics based on the cationic antimicrobial peptide protegrin I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 2055–2064 (2005).
101. Srinivas, N. *et al.* Peptidomimetic Antibiotics Target Outer-Membrane Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **327**, 1010–1013 (2010).
102. Werneburg, M. *et al.* Inhibition of Lipopolysaccharide Transport to the Outer Membrane in Pseudomonas aeruginosa by Peptidomimetic Antibiotics. *ChemBioChem* **13**, 1767–1775 (2012).
103. Andolina, G. *et al.* A Peptidomimetic Antibiotic Interacts with the Periplasmic Domain of LptD from *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **13**, 666–675 (2018).
104. Lehman, K. M. & Grabowicz, M. Countering Gram-Negative Antibiotic Resistance: Recent Progress in Disrupting the Outer Membrane with Novel Therapeutics. *Antibiotics* **8**, 163 (2019).
105. Luther, A. *et al.* Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature* **576**, 452–458 (2019).

106. Fehlbaum, P. *et al*. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1221–1225 (1996).
107. Vetterli, S. U. *et al*. Thanatin targets the intermembrane protein complex required for lipopolysaccharide transport in *Escherichia coli*. *Sci. Adv.* **4**, eaau2634 (2018).
108. Schultz, K. M., Feix, J. B. & Klug, C. S. Disruption of LptA oligomerization and affinity of the LptA–LptC interaction. *Protein Science* **22**, 1639–1645 (2013).
109. Moura, E. C. C. M. *et al*. Thanatin Impairs Lipopolysaccharide Transport Complex Assembly by Targeting LptC–LptA Interaction and Decreasing LptA Stability. *Front. Microbiol.* **11**, 909 (2020).
110. Schuster, M. *et al*. Peptidomimetic antibiotics disrupt the lipopolysaccharide transport bridge of drug-resistant Enterobacteriaceae. *Sci. Adv.* **9**, eadg3683 (2023).
111. Zhang, X. *et al*. Identification of an anti-Gram-negative bacteria agent disrupting the interaction between lipopolysaccharide transporters LptA and LptC. *International Journal of Antimicrobial Agents* **53**, 442–448 (2019).
112. Fiorentino, F., Rotili, D., Mai, A., Bolla, J. R. & Robinson, C. V. Mass spectrometry enables the discovery of inhibitors of an LPS transport assembly *via* disruption of protein–protein interactions. *Chem. Commun.* **57**, 10747–10750 (2021).
113. Zampaloni, C. *et al*. A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter. *Nature* **625**, 566–571 (2024).
114. Butler, M. S. *et al*. A Review of Antibacterial Candidates with New Modes of Action. *ACS Infect. Dis.* acsinfecdis.4c00218 (2024) doi:10.1021/acsinfecdis.4c00218.
115. Pahil, K. S. *et al*. A new antibiotic traps lipopolysaccharide in its intermembrane transporter. *Nature* **625**, 572–577 (2024).
116. Moffatt, J. H. *et al*. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4971–4977 (2010).
117. Kovacs-Simon, A., Titball, R. W. & Michell, S. L. Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *Infect Immun* **79**, 548–561 (2011).
118. Braun, V. & Rehn, K. Chemical Characterization, Spatial Distribution and Function of a Lipoprotein (Murein-Lipoprotein) of the E. coli Cell Wall. The Specific Effect of Trypsin on the Membrane Structure. *Eur J Biochem* **10**, 426–438 (1969).
119. Shruthi, H., Madan Babu, M. & Sankaran, K. TAT-Pathway-Dependent Lipoproteins as a Niche-Based Adaptation in Prokaryotes. *J Mol Evol* **70**, 359–370 (2010).
120. Babu, M. M. *et al*. A Database of Bacterial Lipoproteins (DOLOP) with Functional Assignments to Predicted Lipoproteins. *J Bacteriol* **188**, 2761–2773 (2006).
121. Sankaran, K. & Wu, H. C. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19701–19706 (1994).
122. Yamagata, H., Taguchi, N., Daishima, K. & Mizushima, S. Genetic characterization of a gene for prolipoprotein signal peptidase in Escherichia coli. *Molec Gen Genet* **192**, 10–14 (1983).
123. Gupta, S. D., Gan, K., Schmid, M. B. & Wu, H. C. Characterization of a temperature-sensitive mutant of Salmonella typhimurium defective in apolipoprotein N-acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 16551–16556 (1993).
124. Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. & Tokuda, H. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol* **2**, 212–218 (2000).
125. Yakushi, T., Yokota, N., Matsuyama, S. & Tokuda, H. LolA-dependent Release of a Lipid-modified Protein from the Inner Membrane of Escherichia coli Requires Nucleoside

Triphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32576–32581 (1998).
126. Okuda, S. & Tokuda, H. Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5877–5882 (2009).
127. Tsukahara, J., Mukaiyama, K., Okuda, S., Narita, S. & Tokuda, H. Dissection of LolB function – lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers. *The FEBS Journal* **276**, 4496–4504 (2009).
128. Dev, I. K., Harvey, R. J. & Ray, P. H. Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 5891–5894 (1985).
129. Kiho, T. *et al.* Structure–activity relationships of globomycin analogues as antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 337–361 (2004).
130. Xiao, Y., Gerth, K., Müller, R. & Wall, D. Myxobacterium-Produced Antibiotic TA (Myxovirescin) Inhibits Type II Signal Peptidase. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2014–2021 (2012).
131. Olatunji, S. *et al.* Structures of lipoprotein signal peptidase II from Staphylococcus aureus complexed with antibiotics globomycin and myxovirescin. *Nat Commun* **11**, 140 (2020).
132. Oves-Costales, D. *et al.* Identification and heterologous expression of the globomycin biosynthetic gene cluster. *Synthetic and Systems Biotechnology* **8**, 206–212 (2023).
133. Yakushi, T., Tajima, T., Matsuyama, S. & Tokuda, H. Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of Escherichia coli. *J Bacteriol* **179**, 2857–2862 (1997).
134. Zwiebel, L. J., Inukai, M., Nakamura, K. & Inouye, M. Preferential selection of deletion mutations of the outer membrane lipoprotein gene of Escherichia coli by globomycin. *J Bacteriol* **145**, 654–656 (1981).
135. Ito, H. *et al.* A New Screening Method to Identify Inhibitors of the Lol (Localization of lipoproteins) System, a Novel Antibacterial Target. *Microbiology and Immunology* **51**, 263–270 (2007).
136. Pathania, R. *et al.* Chemical genomics in Escherichia coli identifies an inhibitor of bacterial lipoprotein targeting. *Nat Chem Biol* **5**, 849–856 (2009).
137. Muheim, C. *et al.* Increasing the permeability of Escherichia coli using MAC13243. *Sci Rep* **7**, 17629 (2017).
138. Liu, J. *et al.* Natural Inhibitors Targeting the Localization of Lipoprotein System in Vibrio parahaemolyticus. *IJMS* **23**, 14352 (2022).
139. Nayar, A. S. *et al.* Novel Antibacterial Targets and Compounds Revealed by a High-Throughput Cell Wall Reporter Assay. *J Bacteriol* **197**, 1726–1734 (2015).
140. Nickerson, N. N. *et al.* A Novel Inhibitor of the LolCDE ABC Transporter Essential for Lipoprotein Trafficking in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, e02151-17 (2018).
141. Legood, S., Seng, D., Boneca, I. G. & Buddelmeijer, N. A Defect in Lipoprotein Modification by Lgt Leads to Abnormal Morphology and Cell Death in Escherichia coli That Is Independent of Major Lipoprotein Lpp. *J Bacteriol* **204**, e00164-22 (2022).
142. Diao, J. *et al.* Inhibition of Escherichia coli Lipoprotein Diacylglyceryl Transferase Is Insensitive to Resistance Caused by Deletion of Braun's Lipoprotein. *J Bacteriol* **203**, (2021).
143. Lee, T.-H., N. Hall, K. & Aguilar, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *CTMC* **16**, 25–39 (2015).
144. Pavithrra, G. & Rajasekaran, R. Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic

Resistance: A Review. *Int J Pept Res Ther* **26**, 191–199 (2020).
145. Chen, N. & Jiang, C. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry* **255**, 115377 (2023).
146. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238–250 (2005).
147. Velkov, T., Thompson, P. E., Azad, M. A. K., Roberts, K. D. & Bergen, P. J. History, Chemistry and Antibacterial Spectrum. in *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside* (eds. Li, J., Nation, R. L. & Kaye, K. S.) vol. 1145 15–36 (Springer International Publishing, Cham, 2019).
148. Aslan, A. T., Akova, M. & Paterson, D. L. Next-Generation Polymyxin Class of Antibiotics: A Ray of Hope Illuminating a Dark Road. *Antibiotics* **11**, 1711 (2022).
149. Velkov, T., Thompson, P. E., Nation, R. L. & Li, J. Structure−Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **53**, 1898–1916 (2010).
150. Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S. & Bishop, R. E. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 295–329 (2007).
151. Chen, H. D. & Groisman, E. A. The Biology of the PmrA/PmrB Two-Component System: The Major Regulator of Lipopolysaccharide Modifications. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 83–112 (2013).
152. Khadka, N. K., Aryal, C. M. & Pan, J. Lipopolysaccharide-Dependent Membrane Permeation and Lipid Clustering Caused by Cyclic Lipopeptide Colistin. *ACS Omega* **3**, 17828–17834 (2018).
153. Sabnis, A. *et al.* Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *eLife* **10**, e65836 (2021).
154. Liu, Y.-Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 161–168 (2016).
155. Buchholz, K. R. *et al.* Potent activity of polymyxin B is associated with long-lived super-stoichiometric accumulation mediated by weak-affinity binding to lipid A. *Nat Commun* **15**, 4733 (2024).
156. Süssmuth, R. D. & Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angew Chem Int Ed* **56**, 3770–3821 (2017).
157. Liu, Y., Ding, S., Shen, J. & Zhu, K. Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrug-resistant bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 573–592 (2019).
158. Li, Y.-X., Zhong, Z., Zhang, W.-P. & Qian, P.-Y. Discovery of cationic nonribosomal peptides as Gram-negative antibiotics through global genome mining. *Nat Commun* **9**, 3273 (2018).
159. Zhao, X. *et al.* Elucidating the Mechanism of Action of the Gram-Negative-Pathogen-Selective Cyclic Antimicrobial Lipopeptide Brevicidine. *Antimicrob Agents Chemother* **67**, e00010-23 (2023).
160. Zhao, X., Li, Z. & Kuipers, O. P. Mimicry of a Non-ribosomally Produced Antimicrobial, Brevicidine, by Ribosomal Synthesis and Post-translational Modification. *Cell Chemical Biology* **27**, 1262-1271.e4 (2020).
161. Al Ayed, K. *et al.* Synthetic studies with the brevicidine and laterocidine lipopeptide antibiotics including analogues with enhanced properties and *in vivo* efficacy. *Chem. Sci.* **13**, 3563–3570 (2022).
162. Ballantine, R. D. *et al.* Synthesis and structure–activity relationship studies of N-terminal analogues of the lipopeptide antibiotics brevicidine and laterocidine. *RSC Med. Chem.* **13**, 1640–1643 (2022).
163. Ballantine, R. D. *et al.* Linearization of the Brevicidine and Laterocidine Lipopeptides Yields Analogues That Retain Full Antibacterial Activity. *J. Med. Chem.* **66**,

6002–6009 (2023).
164. Yang, P. *et al*. A novel antimicrobial peptide with broad-spectrum and exceptional stability derived from the natural peptide Brevicidine. *European Journal of Medicinal Chemistry* **269**, 116337 (2024).
165. Huang, E. & Yousef, A. E. The Lipopeptide Antibiotic Paenibacterin Binds to the Bacterial Outer Membrane and Exerts Bactericidal Activity through Cytoplasmic Membrane Damage. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2700–2704 (2014).
166. Li, Z. *et al*. Characterization of two relacidines belonging to a novel class of circular lipopeptides that act against Gram-negative bacterial pathogens. *Environmental Microbiology* **22**, 5125–5136 (2020).
167. Cochrane, S. A. *et al*. Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A $_1$ selectively binds to Gram-negative lipid II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 11561–11566 (2016).
168. Shoji, J. *et al*. Isolation of tridecaptins A, B and C. Studies on antibiotics from the genus Bacillus. XXIII. *J. Antibiot.* **31**, 646–651 (1978).
169. Bann, S. J., Ballantine, R. D. & Cochrane, S. A. The tridecaptins: non-ribosomal peptides that selectively target Gram-negative bacteria. *RSC Med. Chem.* **12**, 538–551 (2021).
170. Cochrane, S. A. & Vederas, J. C. Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Medicinal Research Reviews* **36**, 4–31 (2016).
171. Jähne, J. *et al*. Investigation of the potential of Brevibacillus spp. for the biosynthesis of nonribosomally produced bioactive compounds by combination of genome mining with MALDI-TOF mass spectrometry. *Front. Microbiol.* **14**, 1286565 (2023).
172. Farha, M. A. & Brown, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* **4**, 565–577 (2019).
173. Brochado, A. R. *et al*. Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature* **559**, 259–263 (2018).
174. Ejim, L. *et al*. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol* **7**, 348–350 (2011).
175. Blair, J. M. A. & Piddock, L. J. V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. *mBio* **7**, e00840-16 (2016).
176. Bohnert, J. A., Karamian, B. & Nikaido, H. Optimized Nile Red Efflux Assay of AcrAB-TolC Multidrug Efflux System Shows Competition between Substrates. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3770–3775 (2010).
177. Bohnert, J. A., Schuster, S., Szymaniak-Vits, M. & Kern, W. V. Determination of Real-Time Efflux Phenotypes in Escherichia coli AcrB Binding Pocket Phenylalanine Mutants Using a 1,2'-Dinaphthylamine Efflux Assay. *PLoS ONE* **6**, e21196 (2011).
178. Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K. & Ren, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* **15**, 36 (2015).
179. Klobucar, K. *et al*. Chemical Screen for Vancomycin Antagonism Uncovers Probes of the Gram-Negative Outer Membrane. *ACS Chem. Biol.* **16**, 929–942 (2021).
180. Hong, S. Y., Oh, J. E. & Lee, K.-H. Effect of d-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. *Biochemical Pharmacology* **58**, 1775–1780 (1999).
181. Li, Q. *et al*. Outer-membrane-acting peptides and lipid II-targeting antibiotics cooperatively kill Gram-negative pathogens. *Commun Biol* **4**, 31 (2021).
182. Xia, Y. *et al*. Elucidating the mechanism by which synthetic helper peptides sensitize Pseudomonas aeruginosa to multiple antibiotics. *PLoS Pathog* **17**, e1009909 (2021).

183. Song, M. *et al*. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nat Microbiol* **5**, 1040–1050 (2020).
184. Yang, Z. *et al*. Synergy of outer membrane disruptor SLAP-S25 with hydrophobic antibiotics against Gram-negative pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **78**, 263–271 (2023).
185. Hyun, S. *et al*. Proline Hinged Amphipathic α-Helical Peptide Sensitizes Gram-Negative Bacteria to Various Gram-Positive Antibiotics. *J. Med. Chem.* **63**, 14937–14950 (2020).
186. Konai, M. M. & Haldar, J. Fatty Acid Comprising Lysine Conjugates: Anti-MRSA Agents That Display In Vivo Efficacy by Disrupting Biofilms with No Resistance Development. *Bioconjugate Chem.* **28**, 1194–1204 (2017).
187. Konai, M. M. & Haldar, J. Lysine-Based Small Molecule Sensitizes Rifampicin and Tetracycline against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect. Dis.* **6**, 91–99 (2020).
188. Kim, S.-H. *et al*. Development of Novel Membrane Disrupting Lipoguanidine Compounds Sensitizing Gram-Negative Bacteria to Antibiotics. *ACS Med. Chem. Lett.* **15**, 239–249 (2024).
189. Stokes, J. M. *et al*. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. *Nat Microbiol* **2**, 17028 (2017).
190. MacNair, C. R. *et al*. Preclinical Development of Pentamidine Analogs Identifies a Potent and Nontoxic Antibiotic Adjuvant. *ACS Infect. Dis.* **8**, 768–777 (2022).
191. Vaara, M. *et al*. A Novel Polymyxin Derivative That Lacks the Fatty Acid Tail and Carries Only Three Positive Charges Has Strong Synergism with Agents Excluded by the Intact Outer Membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3341–3346 (2010).
192. French, S. *et al*. Potentiation of Antibiotics against Gram-Negative Bacteria by Polymyxin B Analogue SPR741 from Unique Perturbation of the Outer Membrane. *ACS Infect. Dis.* **6**, 1405–1412 (2020).
193. Corbett, D. *et al*. Potentiation of Antibiotic Activity by a Novel Cationic Peptide: Potency and Spectrum of Activity of SPR741. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e00200-17 (2017).
194. Sader, H. S. *et al*. Antimicrobial activity of POL7306 tested against clinical isolates of Gram-negative bacteria collected worldwide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **75**, 1518–1524 (2020).
195. Jenkins, R. J. & Dotson, G. D. Dual Targeting Antibacterial Peptide Inhibitor of Early Lipid A Biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1170–1177 (2012).
196. Onishi, H. R. *et al*. Antibacterial Agents That Inhibit Lipid A Biosynthesis. *Science* **274**, 980–982 (1996).
197. Cohen, F. *et al*. Optimization of LpxC Inhibitors for Antibacterial Activity and Cardiovascular Safety. *ChemMedChem* **14**, 1560–1572 (2019).
198. Mandler, M. D. *et al*. Novobiocin Enhances Polymyxin Activity by Stimulating Lipopolysaccharide Transport. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 6749–6753 (2018).
199. Sherman, D. J., Okuda, S., Denny, W. A. & Kahne, D. Validation of inhibitors of an ABC transporter required to transport lipopolysaccharide to the cell surface in Escherichia coli. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21**, 4846–4851 (2013).
200. Buss, J. A. *et al*. Pathway-Directed Screen for Inhibitors of the Bacterial Cell Elongation Machinery. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, e01530-18 (2019).
201. Zurawski, D. V. *et al*. SPR741, an Antibiotic Adjuvant, Potentiates the *In Vitro* and *In Vivo* Activity of Rifampin against Clinically Relevant Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e01239-17 (2017).
202. Eckburg, P. B. *et al*. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Drug Interaction

Potential of SPR741, an Intravenous Potentiator, after Single and Multiple Ascending Doses and When Combined with β-Lactam Antibiotics in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, e00892-19 (2019).
203. Akhoundsadegh, N., Belanger, C. R. & Hancock, R. E. W. Outer Membrane Interaction Kinetics of New Polymyxin B Analogs in Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* **63**, e00935-19 (2019).
204. Mendes, R. E. *et al*. Evaluation of Antimicrobial Effects of a New Polymyxin Molecule (SPR741) When Tested in Combination with a Series of β-Lactam Agents Against a Challenge Set of Gram-Negative Pathogens. *Microbial Drug Resistance* **26**, 319–328 (2020).
205. Brown, P. *et al*. Design of Next Generation Polymyxins with Lower Toxicity: The Discovery of SPR206. *ACS Infect. Dis.* **5**, 1645–1656 (2019).
206. Bruss, J. *et al*. Single- and Multiple-Ascending-Dose Study of the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of the Polymyxin Derivative SPR206. *Antimicrob Agents Chemother* **65**, e00739-21 (2021).
207. Rodvold, K. A., Bader, J., Bruss, J. B. & Hamed, K. Pharmacokinetics of SPR206 in Plasma, Pulmonary Epithelial Lining Fluid, and Alveolar Macrophages following Intravenous Administration to Healthy Adult Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **67**, e00426-23 (2023).
208. Bruss, J. B., Bader, J. & Hamed, K. A. Safety and pharmacokinetics of SPR206 in subjects with varying degrees of renal impairment. *Antimicrob Agents Chemother* **67**, e00505-23 (2023).
209. Lepak, A. J., Wang, W. & Andes, D. R. Pharmacodynamic Evaluation of MRX-8, a Novel Polymyxin, in the Neutropenic Mouse Thigh and Lung Infection Models against Gram-Negative Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, e01517-20 (2020).
210. Duncan, L. R., Wang, W. & Sader, H. S. *In Vitro* Potency and Spectrum of the Novel Polymyxin MRX-8 Tested against Clinical Isolates of Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **66**, e00139-22 (2022).
211. Roberts, K. D. *et al*. A synthetic lipopeptide targeting top-priority multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Nat Commun* **13**, 1625 (2022).
212. Lorenzi, V. *et al*. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2209–2211 (2009).
213. Brunel, J. M., Lieutaud, A., Lome, V., Pagès, J.-M. & Bolla, J.-M. Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21**, 1174–1179 (2013).
214. Borselli, D. *et al*. Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of P. aeruginosa to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro. *PLoS ONE* **11**, e0154490 (2016).
215. Hancock, R. E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *CLIN INFECT DIS* **27**, S93–S99 (1998).
216. Li, X.-Z., Zhang, L. & Poole, K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**, 433–436 (2000).
217. Kaščáková, S., Maigre, L., Chevalier, J., Réfrégiers, M. & Pagès, J.-M. Antibiotic Transport in Resistant Bacteria: Synchrotron UV Fluorescence Microscopy to Determine Antibiotic Accumulation with Single Cell Resolution. *PLoS ONE* **7**, e38624 (2012).
218. Vergalli, J. *et al*. Fluoroquinolone structure and translocation flux across bacterial membrane. *Sci Rep* **7**, 9821 (2017).
219. Nikaido, H. & Thanassi, D. G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples.

Antimicrob Agents Chemother **37**, 1393–1399 (1993).
220. Michéa-Hamzehpour, M., Furet, Y. X. & Pechère, J. C. Role of protein D2 and lipopolysaccharide in diffusion of quinolones through the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 2091–2097 (1991).
221. Vergalli, J. *et al*. Spectrofluorimetric quantification of antibiotic drug concentration in bacterial cells for the characterization of translocation across bacterial membranes. *Nat Protoc* **13**, 1348–1361 (2018).
222. Hoegy, F., Mislin, G. L. A. & Schalk, I. J. Pyoverdine and Pyochelin Measurements. in *Pseudomonas Methods and Protocols* (eds. Filloux, A. & Ramos, J.-L.) vol. 1149 293–301 (Springer New York, New York, NY, 2014).
223. Mamelli, L., Prouzet-Mauléon, V., Pagès, J.-M., Mégraud, F. & Bolla, J.-M. Molecular basis of macrolide resistance in Campylobacter: role of efflux pumps and target mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 491–497 (2005).
224. Fey, G., Reiss, M. & Kersten, H. Interaction of tetracyclines with ribosomal subunits from Escherichia coli. Fluorometric investigation.
225. Ejim, L. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *nature chemical biology* **7**, (2011).
226. Uppu, D. S. S. M. *et al*. Membrane-Active Macromolecules Resensitize NDM-1 Gram-Negative Clinical Isolates to Tetracycline Antibiotics. *PLoS ONE* **10**, e0119422 (2015).
227. Wang, Y.-K. *et al*. Comparison of Escherichia coli surface attachment methods for single-cell microscopy. *Sci Rep* **9**, 19418 (2019).
228. Wood, S., Miller, K. & David, S. Anti-Endotoxin Agents. 1. Development of a Fluorescent Probe Displacement Method Optimized for the Rapid Identification of Lipopolysaccharide-Binding Agents. *CCHTS* **7**, 239–249 (2004).
229. King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L. & Lam, J. S. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun* **15**, 261–312 (2009).
230. Wang, G. *et al*. The membrane-active polyaminoisoprenyl compound NV716 re-sensitizes Pseudomonas aeruginosa to antibiotics and reduces bacterial virulence. *Commun Biol* **5**, 871 (2022).
231. Urfer, M. *et al*. A Peptidomimetic Antibiotic Targets Outer Membrane Proteins and Disrupts Selectively the Outer Membrane in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 1921–1932 (2016).
232. Kociak, M. Introduction à la microscopie électronique. *JDN* **12**, 61–74 (2007).
233. Rao, N. N., Gómez-García, M. R. & Kornberg, A. Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 605–647 (2009).
234. Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C.-M. & Kornberg, A. Novel Assay Reveals Multiple Pathways Regulating Stress-Induced Accumulations of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 1841–1847 (1998).
235. Takade, A., Umeda, A., Misumi, T., Sawae, Y. & Amako, K. Accumulation of Phosphate-Containing Granules in the Nucleoid Area of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Immunology* **35**, 367–374 (1991).
236. Racki, L. R. *et al*. Polyphosphate granule biogenesis is temporally and functionally tied to cell cycle exit during starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, (2017).
237. Beaufay, F. *et al*. Polyphosphate drives bacterial heterochromatin formation. *Sci. Adv.* **7**, eabk0233 (2021).
238. Kumar, S. *et al*. Bacterial Membrane Vesicles as a Novel Strategy for Extrusion of Antimicrobial Bismuth Drug in Helicobacter pylori. *mBio* **13**, e01633-22 (2022).
239. Chawla, R., Klupt, S., Patsalo, V., Williamson, J. R. & Racki, L. R. The Histone H1-

Like Protein AlgP Facilitates Even Spacing of Polyphosphate Granules in Pseudomonas aeruginosa. *mBio* **13**, e02463-21 (2022).
240. Magkiriadou, S., Stepp, W. L., Newman, D. K., Manley, S. & Racki, L. R. Polyphosphate affects cytoplasmic and chromosomal dynamics in nitrogen-starved *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **121**, e2313004121 (2024).
241. Pereiro, E., Nicolás, J., Ferrer, S. & Howells, M. R. A soft X-ray beamline for transmission X-ray microscopy at ALBA. *J Synchrotron Rad* **16**, 505–512 (2009).
242. Sorrentino, A. *et al.* MISTRAL: a transmission soft X-ray microscopy beamline for cryo nano-tomography of biological samples and magnetic domains imaging. *J Synchrotron Rad* **22**, 1112–1117 (2015).
243. Groen, J., Conesa, J. J., Valcárcel, R. & Pereiro, E. The cellular landscape by cryo soft X-ray tomography. *Biophys Rev* **11**, 611–619 (2019).
244. Deatherage, B. L. & Cookson, B. T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect Immun* **80**, 1948–1957 (2012).
245. Gill, S., Catchpole, R. & Forterre, P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* **43**, 273–303 (2019).
246. Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* **17**, 13–24 (2019).
247. Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C. & Mercade, E. Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *PLoS ONE* **10**, e0116896 (2015).
248. Turnbull, L. *et al.* Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* **7**, 11220 (2016).
249. Kulp, A. & Kuehn, M. J. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 163–184 (2010).
250. Kulkarni, H. M. & Jagannadham, M. V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology* **160**, 2109–2121 (2014).
251. Zavan, L. *et al.* The mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicle biogenesis determines their protein composition. *Proteomics* **23**, 2200464 (2023).
252. Kadurugamuwa, J. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by Pseudomonas aeruginosa and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 615–621 (1997).
253. Manning, A. J. & Kuehn, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**, 258 (2011).
254. Delgado, L., Baeza, N., Pérez-Cruz, C., López-Iglesias, C. & Mercade, E. Cryo-transmission Electron Microscopy of Outer-inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-negative Pathogenic Bacteria. *BIO-PROTOCOL* **9**, (2019).
255. Anderson, A. J. & Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *MICROBIOL. REV.* **54**, (1990).
256. Pham, T. H. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by Pseudomonas aeruginosa in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* **150**, 3405–3413 (2004).
257. Obruca, S. *et al.* Novel unexpected functions of PHA granules. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 4795–4810 (2020).
258. Jendrossek, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *J Bacteriol* **191**, 3195–3202 (2009).
259. Galán, B. *et al.* Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442.

Molecular Microbiology **79**, 402–418 (2011).
260. Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S. & Jendrossek, D. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha. *BMC Microbiol* **12**, 262 (2012).
261. Timm, A. & Steinbüchel, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3360–3367 (1990).
262. Tian, J., Sinskey, A. J. & Stubbe, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *J Bacteriol* **187**, 3814–3824 (2005).
263. Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J. & Jensen, G. J. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in Ralstonia eutropha. *Journal of Bacteriology* **194**, 1092–1099 (2012).
264. Hill, L., Veli, N. & Coote, P. J. Evaluation of Galleria mellonella larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against Pseudomonas aeruginosa infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* **43**, 254–261 (2014).
265. Adamson, D. H., Krikstopaityte, V. & Coote, P. J. Enhanced efficacy of putative efflux pump inhibitor/antibiotic combination treatments versus MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Galleria mellonella in vivo* infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 2271–2278 (2015).
266. Davis, T. D., Gerry, C. J. & Tan, D. S. General Platform for Systematic Quantitative Evaluation of Small-Molecule Permeability in Bacteria. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2535–2544 (2014).
267. Zhou, Y. *et al.* Thinking Outside the "Bug": A Unique Assay To Measure Intracellular Drug Penetration in Gram-Negative Bacteria. *Anal. Chem.* **87**, 3579–3584 (2015).
268. Iyer, R. *et al.* Evaluating LC–MS/MS To Measure Accumulation of Compounds within Bacteria. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1336–1345 (2018).
269. Leus, I. V. *et al.* Functional Diversity of Gram-Negative Permeability Barriers Reflected in Antibacterial Activities and Intracellular Accumulation of Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **67**, e01377-22 (2023).
270. Sanchez-Cano, C. *et al.* Synchrotron X-Ray Fluorescence Nanoprobe Reveals Target Sites for Organo-Osmium Complex in Human Ovarian Cancer Cells. *Chemistry A European J* **23**, 2512–2516 (2017).
271. Conesa, J. J. *et al.* Unambiguous Intracellular Localization and Quantification of a Potent Iridium Anticancer Compound by Correlative 3D Cryo X-Ray Imaging. *Angew Chem Int Ed* **59**, 1270–1278 (2020).
272. Koba, R. *et al.* Quantitative evaluation of the intratumoral distribution of platinum in oxaliplatin-treated rectal cancer: *In situ* visualization of platinum *via* synchrotron radiation X-ray fluorescence spectrometry. *Intl Journal of Cancer* **146**, 2498–2509 (2020).
273. Lovett, J. H. & Harris, H. H. Application of X-ray absorption and X-ray fluorescence techniques to the study of metallodrug action. *Current Opinion in Chemical Biology* **61**, 135–142 (2021).
274. Hernández-Gil, J. *et al.* Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10 phenanthroline. *Polyhedron* **28**, 138–144 (2009).
275. Feio, M. J. *et al.* Fluoroquinolone–metal complexes: A route to counteract bacterial resistance? *Journal of Inorganic Biochemistry* **138**, 129–143 (2014).
276. Ferreira, M. & Gameiro, P. Fluoroquinolone-Transition Metal Complexes: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance. *Microorganisms* **9**, 1506 (2021).
277. Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H. & Berger, J. M. All tangled up: how cells

direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 827–841 (2011).
278. Bush, N. G., Evans-Roberts, K. & Maxwell, A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* **6**, 10.1128/ecosalplus.ESP-0010–2014 (2015).
279. Stracy, M. *et al*. Single-molecule imaging of DNA gyrase activity in living *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **47**, 210–220 (2019).
280. Collin, F., Karkare, S. & Maxwell, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**, 479–497 (2011).
281. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M. & Nakamura, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1271–1272 (1990).
282. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L. M. & Nakamura, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1647–1650 (1991).
283. Borkow, G. & Gabbay, J. Copper as a Biocidal Tool. *CMC* **12**, 2163–2175 (2005).
284. Wiebelhaus, N., Zaengle-Barone, J. M., Hwang, K. K., Franz, K. J. & Fitzgerald, M. C. Protein Folding Stability Changes Across the Proteome Reveal Targets of Cu Toxicity in *E. coli*. *ACS Chem. Biol.* **16**, 214–224 (2021).
285. Zuily, L. *et al*. Copper Induces Protein Aggregation, a Toxic Process Compensated by Molecular Chaperones. *mBio* **13**, e03251-21 (2022).
286. Bos, J., Cisneros, L. H. & Mazel, D. Real-time tracking of bacterial membrane vesicles reveals enhanced membrane traffic upon antibiotic exposure. *Sci. Adv.* **7**, eabd1033 (2021).
287. Thoma, J. *et al*. Protein-enriched outer membrane vesicles as a native platform for outer membrane protein studies. *Commun Biol* **1**, 23 (2018).
288. James, C. E. *et al*. How β-Lactam Antibiotics Enter Bacteria: A Dialogue with the Porins. *PLoS ONE* **4**, e5453 (2009).
289. Masi, M. *et al*. Cephalosporin translocation across enterobacterial OmpF and OmpC channels, a filter across the outer membrane. *Commun Biol* **5**, 1059 (2022).
290. Dwyer, D. J., Collins, J. J. & Walker, G. C. Unraveling the Physiological Complexities of Antibiotic Lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332 (2015).
291. Hong, Y., Li, L., Luan, G., Drlica, K. & Zhao, X. Contribution of reactive oxygen species to thymineless death in Escherichia coli. *Nat Microbiol* **2**, 1667–1675 (2017).
292. Kalyanaraman, B. *et al*. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1–6 (2012).
293. Stubbe, J. *et al*. NONTEMPLATE-DEPENDENT POLYMERIZATION PROCESSES: Polyhydroxyalkanoate Synthases as a Paradigm. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 433–480 (2005).
294. Boutte, C. C., Henry, J. T. & Crosson, S. ppGpp and Polyphosphate Modulate Cell Cycle Progression in Caulobacter crescentus. *Journal of Bacteriology* **194**, 28–35 (2012).
295. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settingsq. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001).
296. O'Shea, R. & Moser, H. E. Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **51**, 2871–2878 (2008).
297. Luscher, A. *et al*. Combined Bacteriophage and Antibiotic Treatment Prevents Pseudomonas aeruginosa Infection of Wild Type and cftr- Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **11**, 1947 (2020).
298. Dumont, E. *et al*. Antibiotics and efflux: combined spectrofluorimetry and mass

spectrometry to evaluate the involvement of concentration and efflux activity in antibiotic intracellular accumulation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2018) doi:10.1093/jac/dky396.
299. Vergalli, J. *et al.* The challenge of intracellular antibiotic accumulation, a function of fluoroquinolone influx versus bacterial efflux. *Commun Biol* **3**, 198 (2020).
300. Vergalli, J. *et al.* A framework for dissecting affinities of multidrug efflux transporter AcrB to fluoroquinolones. *Commun Biol* **5**, 1062 (2022).
301. Frei, A. *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chem. Sci.* **11**, 2627–2639 (2020).
302. Frei, A., Verderosa, A. D., Elliott, A. G., Zuegg, J. & Blaskovich, M. A. T. Metals to combat antimicrobial resistance. *Nat Rev Chem* **7**, 202–224 (2023).
303. Xia, Y. *et al.* Bismuth-based drugs sensitize Pseudomonas aeruginosa to multiple antibiotics by disrupting iron homeostasis. *Nat Microbiol* **9**, 2600–2613 (2024).
304. Holloway, B. W. Genetic Recombination in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology* **13**, 572–581 (1955).
305. Stover, C. K. *et al.* PAO1, an opportunistic pathogen. **406**, (2000).
306. Gasser, V. *et al.* The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli. *IJMS* **22**, 2814 (2021).
307. Held, K., Ramage, E., Jacobs, M., Gallagher, L. & Manoil, C. Sequence-Verified Two-Allele Transposon Mutant Library for Pseudomonas aeruginosa PAO1. *J Bacteriol* **194**, 6387–6389 (2012).
308. Desmarais, S. M. *et al.* High-throughput, Highly Sensitive Analyses of Bacterial Morphogenesis Using Ultra Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 31090–31100 (2015).
309. D. Edelstein, A. *et al.* Advanced methods of microscope control using μManager software. *JBM* **1**, 1 (2014).
310. Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C. & Myers, G. Cell Detection with Star-convex Polygons. in vol. 11071 265–273 (2018).
311. Loconte, V. *et al.* Soft X-ray tomography to map and quantify organelle interactions at the mesoscale. *Structure* **30**, 510-521.e3 (2022).
312. Otón, J. *et al.* Characterization of transfer function, resolution and depth of field of a soft X-ray microscope applied to tomography enhancement by Wiener deconvolution. *Biomed. Opt. Express* **7**, 5092 (2016).
313. Zheng, S. *et al.* AreTomo: An integrated software package for automated marker-free, motion-corrected cryo-electron tomographic alignment and reconstruction. *Journal of Structural Biology: X* **6**, 100068 (2022).
314. Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. & McIntosh, J. R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *Journal of Structural Biology* **116**, 71–76 (1996).
315. Agulleiro, J.-I. & Fernandez, J.-J. Tomo3D 2.0 – Exploitation of Advanced Vector eXtensions (AVX) for 3D reconstruction. *Journal of Structural Biology* **189**, 147–152 (2015).
316. Cesar Da Silva, J. *et al.* Efficient concentration of high-energy x-rays for diffraction-limited imaging resolution. *Optica* **4**, 492 (2017).
317. Morawe, Ch. *et al.* Graded multilayers for figured Kirkpatrick-Baez mirrors on the new ESRF end station ID16A. in (eds. Goto, S., Morawe, C. & Khounsary, A. M.) 958803 (San Diego, California, United States, 2015). doi:10.1117/12.2189279.
318. Cloetens, P. *et al.* Holotomography: Quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x rays. *Applied Physics Letters* **75**, 2912–2914 (1999).

319. Solé, V. A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, Ph. & Susini, J. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **62**, 63–68 (2007).
320. Gürsoy, D. *et al*. Rapid alignment of nanotomography data using joint iterative reconstruction and reprojection. *Sci Rep* **7**, 11818 (2017).
321. Van Aarle, W. *et al*. Fast and flexible X-ray tomography using the ASTRA toolbox. *Opt. Express* **24**, 25129 (2016).
322. Gürsoy, D., De Carlo, F., Xiao, X. & Jacobsen, C. TomoPy: a framework for the analysis of synchrotron tomographic data. *J Synchrotron Rad* **21**, 1188–1193 (2014).
323. Sanchez-Cano, C. *et al*. X-ray-Based Techniques to Study the Nano–Bio Interface. *ACS Nano* **15**, 3754–3807 (2021).

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. Draveny M, Rose C, Pinet A, Ferrié L, Figadère B, Brunel JM, Masi M. Scope and limitations of exploiting the ability of the chemosensitizer NV716 to enhance the activity of tetracycline derivatives against *Pseudomonas aeruginosa*. Molecules. 2023, 28(11):4262. doi: 10.3390/molecules28114262.
    2. Draveny M*, Chauvet H*, Rouam V, Jamme F, Masi M. Intracellular quantification of an antibiotic metal complex in single cells of *Escherichia coli* using cryo-X-ray fluorescence nano-imaging. ACS Nano. (en révision)
    3. Draveny M*, Chauvet H*, De Pauw A, Rouam V, Girleanu M, Favier AL, Neulat-Ripoll F, Novelli M, Bolla JM, Brunel JM, Jamme F, Masi M. Antibiotic adjuvant NV716 targets the lipopolysaccharide at the bacterial cell surface to overcome the intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and enhances outer membrane vesicle production. (en préparation)
    4. Draveny M & Masi M. Targeting of the Gram-negative outer membrane for antibiotic discovery and potentiation. (en préparation)

2) Participation aux conférences au cours de la période de thèse :
    1. Congrès JSM3 Jeunes Chercheurs de l'IM2B – Mai 2022, Marseille (Poster).
    2. Gordon Research Conference "New Antibacterial Discovery and Development" – Juillet 2022, Italie (Poster).
    3. Journées du département 2MI– Septembre 2022, Institut de Recherche Biomédicales des Armées, Brétigny-sur-Orge (Communication).
    4. One-day Meeting "ABC of Membrane Transport"– Juin 2023, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (Communication).
    5. Congrès annuel de la Société Française de Microbiologie – Octobre 2023, Rennes (Poster).

molecules

MDPI

Article

Scope and Limitations of Exploiting the Ability of the Chemosensitizer NV716 to Enhance the Activity of Tetracycline Derivatives against *Pseudomonas aeruginosa*

Margot Draveny [1,2], Clémence Rose [3], Alexis Pinet [3], Laurent Ferrié [3], Bruno Figadère [3], Jean-Michel Brunel [1] and Muriel Masi [1,2,*]

[1] MCT, INSERM U1261, UMR_MD1, Aix-Marseille Univ. & IRBA SSA, 27 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France; margot.draveny@synchrotron-soleil.fr (M.D.); bruneljm@yahoo.fr (J.-M.B.)
[2] Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Départementale 128, 91190 Saint-Aubin, France
[3] BioCIS, Bâtiment H. Moissan, Université Paris-Saclay, CNRS, 91400 Orsay, France; clemence.rose@live.fr (C.R.); alexis.pinet9@gmail.com (A.P.); laurent.ferrie@universite-paris-saclay.fr (L.F.); bruno.figadere@universite-paris-saclay.fr (B.F.)
* Correspondence: muriel.masi@univ-amu.fr

Abstract: The spread of antibiotic resistance is an urgent threat to global health that requires new therapeutic approaches. Treatments for pathogenic Gram-negative bacteria are particularly challenging to identify due to the robust OM permeability barrier in these organisms. One strategy is to use antibiotic adjuvants, a class of drugs that have no significant antibacterial activity on their own but can act synergistically with certain antibiotics. Previous studies described the discovery and development of polyaminoisoprenyl molecules as antibiotic adjuvants with an OM effect. In particular, the compound NV716 has been shown to sensitize *Pseudomonas aeruginosa* to tetracycline antibiotics such as doxycycline. Here, we sought to explore the disruption of OM to sensitize *P. aeruginosa* to otherwise inactive antimicrobials using a series of tetracycline derivatives in the presence of NV716. We found that OM disruption expands the hydrophobicity threshold consistent with antibacterial activity to include hydrophobic molecules, thereby altering permeation rules in Gram-negative bacteria.

Keywords: Gram-negative bacteria; antibiotic adjuvant; NV716; antibiotic resistance; outer membrane

check for updates

Citation: Draveny, M.; Rose, C.; Pinet, A.; Ferrié, L.; Figadère, B.; Brunel, J.-M.; Masi, M. Scope and Limitations of Exploiting the Ability of the Chemosensitizer NV716 to Enhance the Activity of Tetracycline Derivatives against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules* **2023**, *28*, 4262. https://doi.org/10.3390/molecules28114262

Academic Editors: Danuta Drozdowska and Robert Bucki

Received: 27 April 2023
Revised: 19 May 2023
Accepted: 22 May 2023
Published: 23 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

There is a widely acknowledged need for new antibacterial agents to address the global increase in resistance, and this need is especially urgent to combat antibiotic-resistant Gram-negative bacteria [1,2]. In 2017, the World Health Organization (WHO) assigned the highest priority to antibacterial drug research and development against the Gram-negative bacteria *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and species of *Enterobacteriaceae* that are resistant to carbapenems and usually extensively drug-resistant (XDR) [3]. The same year, the WHO released a clinical pipeline report, which has been updated every year since then. Until 2021, 12 new antibacterial drugs have been approved. However, recently approved antibacterial agents show a limited degree of innovation as most of them are derivatives of existing classes and/or poorly address global public health priorities. The 2021 clinical antibacterial pipeline contains 77 antibiotics and/or combinations that include at least one new therapeutic entity. Of these, 45 are traditional antibacterial agents, including 27 against the WHO priority pathogens, and 32 are non-traditional [4].

The failure of the development of antibiotics active against Gram-negative bacteria is mainly due to the inability of small molecules to accumulate within these bacteria and reach a threshold concentration to inhibit their target [5,6]. Indeed, antibiotics are constrained to two opposite-direction fluxes across the Gram-negative bacterial envelope. First, Gram-negative bacteria are protected by an outer membrane (OM), which reduces the uptake of

toxic compounds [7]. The OM is an asymmetric bilayer composed of lipopolysaccharides (LPS) in the outer leaflet and phospholipids in the inner leaflet. The tight packaging of LPS and its overall negative charge exclude large and hydrophobic molecules [8], and the influx of antibiotics is usually mediated by channel-forming proteins, called porins [7,9]. The general porins OmpF and OmpC of *Escherichia coli* and related enterobacteria are non-specific channels [10] and have quite large pores, allowing the passage of polar compounds below a size limit of ~600 Da, including many antibiotics [7,9]. However, other Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, do not have such large-channel porins and rely on substrate-specific channels to acquire small water-soluble compounds [7,11]. Consequently, their OM is approximately two orders of magnitude less permeable than that of *E. coli* [7]. In addition, antibiotics are also subject to an outgoing flux via transmembrane multidrug efflux pumps (i.e., AcrAB-TolC in *Enterobacteriaceae* and MexAB-OprM in *P. aeruginosa*) that expel them towards the medium [12]. As such, the synergy between limited OM diffusion and active efflux determines antibiotic accumulation and activity [13–15].

In recent years, antibiotic discovery efforts have attempted to increase the intracellular concentration of antibiotics inside Gram-negative bacteria through various approaches, including inhibition of efflux, disruption of the OM, and advances in medicinal chemistry. Regarding the latter aspect, recent studies have expanded the Gram-negative eNTRy "rules," identifying rigid, flat molecules with a positive charge to be more compatible with porin-mediated uptake [16]. These concepts have been applied to modify antibiotics active against Gram-positive for Gram-negative activity [17–19]. While promising, this approach is limited to scaffolds that can be modified without loss of affinity for their target or modification of any other favorable pharmacological properties. An alternative approach is the use of adjuvants capable of disrupting OM integrity, thereby facilitating the entry and accumulation of many otherwise inactive antibiotics in Gram-negative bacteria [20]. Such compounds would immediately expand the range of treatments for Gram-negative pathogens [21].

Since their discovery in 1947, polymyxins have proven to attack the membranes of Gram-negative bacteria. Polymyxins were abandoned in the 1960s because of their nephrotoxicity but are now revived as the last-resort therapy for infections caused by XDR strains [22]. Quite recently, new polymyxin derivatives have been successfully studied preclinically for treating pneumonia caused by *P. aeruginosa* or *A. baumannii* in mouse models [23]. In 2017, the first OM disruptor, SPR741 (in-licensed by Spero Therapeutics and Northern Antibiotics), successfully passed the clinical phase 1 trial and was well tolerated at doses exceeding the dose that should be evaluated in the planned phase 2 [24,25].

Polyamines, like polymyxins, are cationic molecules that target Gram-negative membranes [26]. Among them, the polyaminoisoprenyl compound NV716 is a potent antibiotic adjuvant in several Gram-negative species. Previous studies showed that NV716 restores chloramphenicol and doxycycline activity against *P. aeruginosa* [27] and florfenicol activity against *Bordetella bronchiseptica* [28] in wild-type and clinical or farm strains. It also dramatically increases the activity of almost all the classes of antibiotics in *E. coli*, including that of the large, hydrophobic, and traditionally Gram-positive active antibiotics, such as rifampin and erythromycin; hydrophobic β-lactams such as oxacillin; chloramphenicol; tetracyclines; and nalidixic acid but not fluoroquinolones [Novelli, M.; Brunel, J.-M.; & Bolla, J.-M., in preparation]. NV716 has been shown to reduce active efflux of the 1,2′-DNA fluorescent probe in a dose-dependent real-time efflux assay [29]. However, NV716 is still active in efflux-deficient strains of *E. coli* and *P. aeruginosa*. In addition, several pieces of evidence indicate that NV716 binds to the LPS and acts by disrupting the OM integrity as a major barrier to antibiotic uptake [29–31] (Draveny, M.; Brunel, J.-M.; Jamme, F.; & Masi, M.; in preparation). One can assume this mode of action has much more impact on *P. aeruginosa* than on *E. coli*, whose OM contains the most effective porins.

In recent years, tetracyclines have been considered beyond their antibiotic activity [32]. In particular, the use of tetracyclines is associated with a reduced risk of developing

Parkinson's disease [33]. New tetracycline derivatives were recently synthesized with improved neuroprotective properties and reduced antibiotic activity [34,35]. Herein, we sought to determine whether the potential of OM disruption mediated by NV716 could be used as a therapeutic approach in combination with these new tetracycline derivatives. For this, we studied how the disturbance of the OM affects the entry rules of these compounds in *P. aeruginosa* and identified a significant expansion of the hydrophobicity threshold compatible activity.

2. Results

2.1. OM Perturbation Induced by NV716 Increases the Range of Hydrophobicity of Tetracycline Derivatives Compatible with Antibacterial Activity

NV716 was prepared as previously described [36] in 64% yield that includes a direct nucleophilic substitution of spermine on farnesyl chloride (Figure 1).

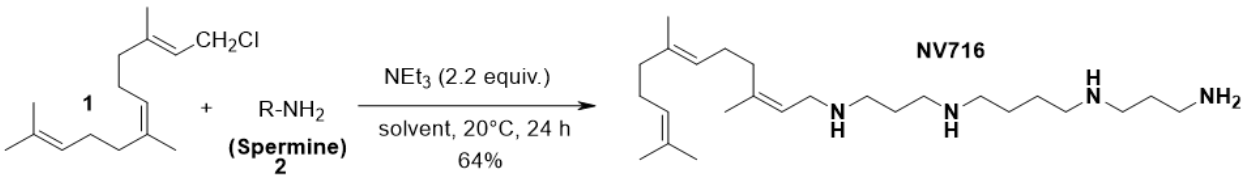


Figure 1. Synthetic pathway of the preparation of polyaminoisoprenyl compound NV716.

Tetracyclines inhibit protein synthesis in Gram-positive and Gram-negative bacteria by preventing the attachment of aminoacyl-tRNA to the ribosomal acceptor (A) site [37]. This mechanism has been confirmed by X-ray crystallography [38]. Original tetracycline derivatives are shown in Figure 2. The rigid skeleton of tetracyclines contains four rings, a lower non-modifiable side that makes contact with the 30S sRNA, and an upper modifiable side (Supplementary Figure S2). All tetracyclines that act as inhibitors of protein synthesis in bacteria require the amino group in position C4 (C4-dimethylamino group for optimal antibacterial activity) and keto-enolic tautomers in positions C1 and C3 of the A ring (R1 in Supplementary Figure S2). COL-3, 4-dedimethylaminosancycline, or incyclinide (3), was the first chemically modified tetracycline that has been structurally rearranged to suppress antibacterial properties by eliminating the C4-dimethylamino group in the A ring while preserving other activities of interest [39]. The D ring is the most permissive for changes. Thus, it can be hypothesized that all subsequent modifications could affect the bacterial activity due to the modification of clogD (R2-R5 in Supplementary Figure S2).

We screened 28 tetracycline derivatives, including three known tetracycline antibiotics and 25 chemically modified derivatives, for their antibacterial activity in *P. aeruginosa* PAO1 and their degree of potentiation by the OM disruptor NV716. In the absence of NV716, the three known tetracycline antibiotics (**3a**–**3c**) showed modest activity with MICs ranging from 6.25 to 12.5 μg/mL, while all the chemically modified derivatives (**3d**–**3ab**) were completely inactive with MICs up to 200–400 μg/mL or higher (Figure 3A and Supplementary Table S1). Of the 28 compounds tested, 18 were potentiated by NV716 with a reduction in MIC of more than 5-fold in bacteria treated with NV716 compared to untreated bacteria (Figure 3A and Supplementary Table S1). As shown previously, NV716 at a concentration of 10 μM consistently decreased the MIC of doxycycline (**3c**) by 62-fold in *P. aeruginosa* PAO1 [27,30]. We next determined the lipophilicity (cLogD, calculated partition coefficient cLogD at pH 7.4) for all the tested compounds and ranked them according to their ability to be potentiated by the addition of NV716 (Figure 3B). As mentioned above, the loss of antibacterial activity of COL-3 and the other derivatives is likely attributable to the removal of the C4-dimethylamino group in the A ring. This modification also increases the hydrophobicity of most of the compounds. Nevertheless, the addition of NV716 expanded the range of cLogDs compatible with antibacterial activity towards more hydrophobic compounds (Figure 3B). Indeed, the MIC values of tetracycline derivatives with a cLogD value between −1.8 and −4.3 are either reduced to a level below

the sensitivity threshold of *P. aeruginosa* (MIC < 2 µg/mL for compounds **3a–3c**; Figure 3B, blue dots) or potentiated from 16 to 128-fold (compounds 3d–3n, Figure 3B, green dots). On the other hand, tetracycline derivatives with a cLogD value above −1.8 cannot be potentiated (compounds **3s–3ab**, Figure 3B, red dots). Some compounds with a cLogD very close to −1.8 are less well potentiated, from 4 to 32-fold, in the presence of NV716 (compounds **3o–3r**, Figure 3B, yellow dots).

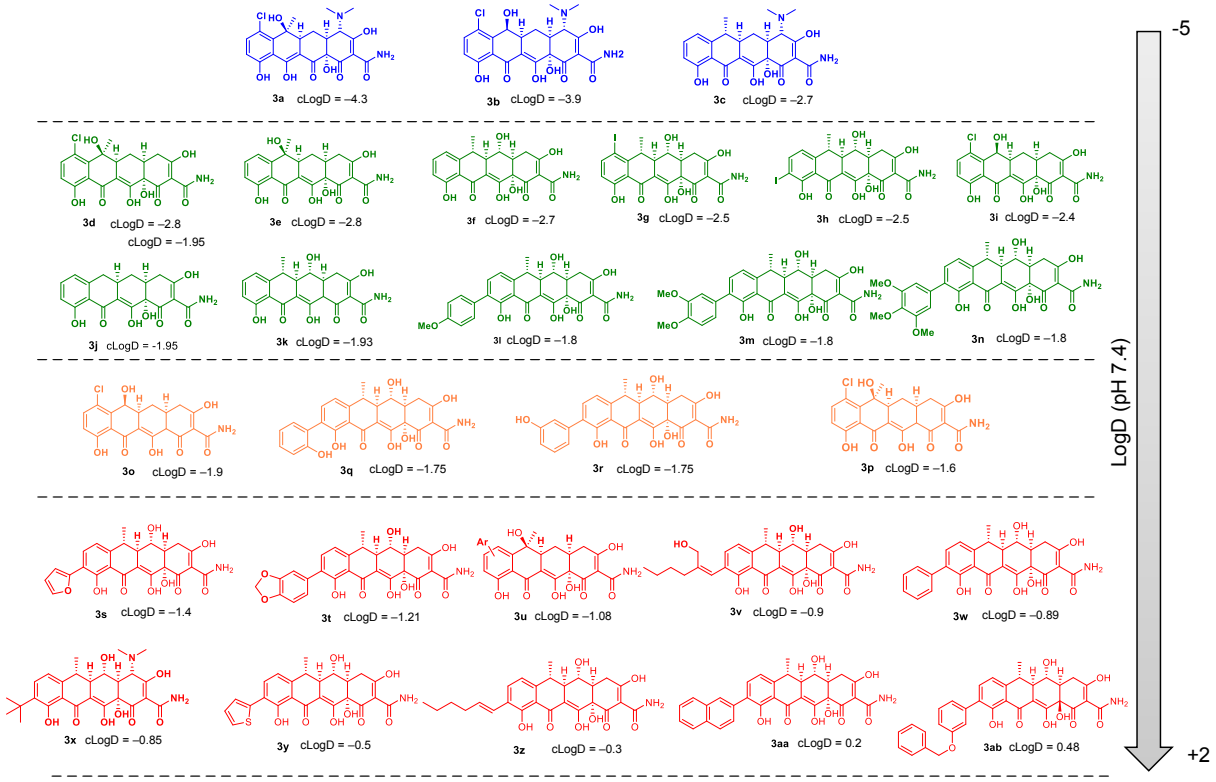


Figure 2. Chemical structures and cLogD values of original tetracycline derivatives **3a–3ab**.

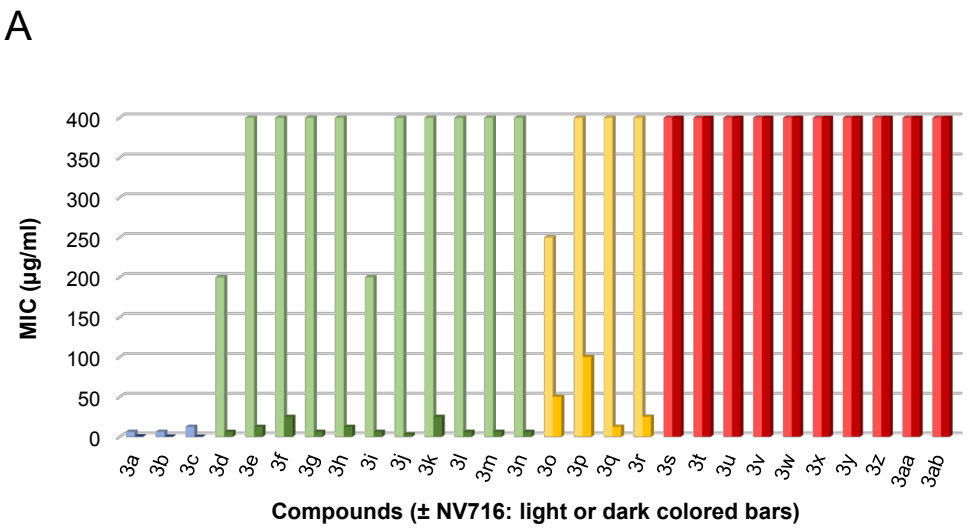


Figure 3. *Cont.*

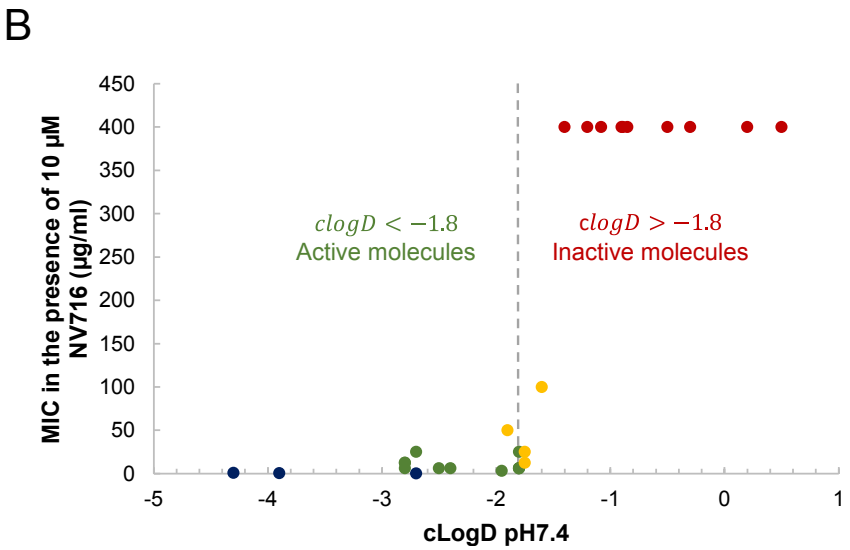


Figure 3. Changes in drug activity following OM disruption by NV716. (**A**) shows that tetracycline derivatives can be potentiated (reduction in MIC ≥ 5 to 128-fold) or unaffected (reduction in MIC < 5-fold) by NV716 added at a final concentration of 10 µM. (**B**) shows the relationship between the MIC determined in the presence of NV716 and the cLogD at pH 7.4. Compounds are colored as follows: only existing tetracycline antibiotics show some antibacterial activity on *P. aeruginosa* in the absence of NV716 (**3a**, **3b,** and **3c** in blue); most of the new tetracycline derivatives are either inactive (red) or active (green) in the presence of NV716 on either side of a virtual cLogD value of −1.8; a few exceptions are weakly active with cLogD~−1.8 (yellow).

2.2. Antibacterial Activity of the Tetracycline Derivatives correlates with Increased Uptake in the Presence of NV716

The OM is a main barrier to the diffusion of antibiotics. Therefore, we next examined how OM perturbation by NV716 affects the accumulation of tetracycline derivatives inside bacteria. For this, we chose doxycycline (**3c**) as a positive control, and **3j** and **3u** as representative compounds respectively potentiated or not by NV716. It is worth noting that the chemical structure **3u** is not fully represented (Figure 2) since it is patent pending in another context. This compound was chosen for this study because of its fluorescence properties and lack of antibacterial activity (i.e., cLogD is incompatible with potentiation by NV716). The fluorescence of doxycycline increases when it binds to its target (i.e., the ribosomes) inside the bacteria. We recently set up a doxycycline uptake assay with intact *P. aeruginosa* cells and demonstrated that NV716 causes an increase in doxycycline uptake (as shown by an increase in fluorescence, AUC × 3.6), indicating that NV716 helps doxycycline get inside the bacteria [Draveny, M.; et al., in prep.] (Figure 4A). Here, NV716 also increased the uptake of **3j** (AUC × 4.2) but not **3u**, consistent with the ability of NV716 to potentiate or not their antibacterial activity (Figure 4B). Together, these results show that disruption of OM by NV716 overcomes the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to hydrophobic compounds as it helps to increase their accumulation and activity. However, these observations could also result from a difference in the affinity of the molecules for their target. Therefore, we elucidated the inhibition of translation in an *E. coli* cell-free transcription-translation system using GFP as a reporter protein. Here, we found that compounds **3j** and **3u** similarly inhibit the production of GFP (inhibitory concentration 50%, IC_{50} = 575.2 ± 1.07 µM and IC_{50} = 603.3 ± 1.39 µM, respectively) (Figure 5). Noteworthy, doxycycline was approximately 30-fold more active in inhibiting bacterial translation compared to the tetracycline derivatives (IC_{50} = 19.71 ± 1.38 µM) (Figure 5).

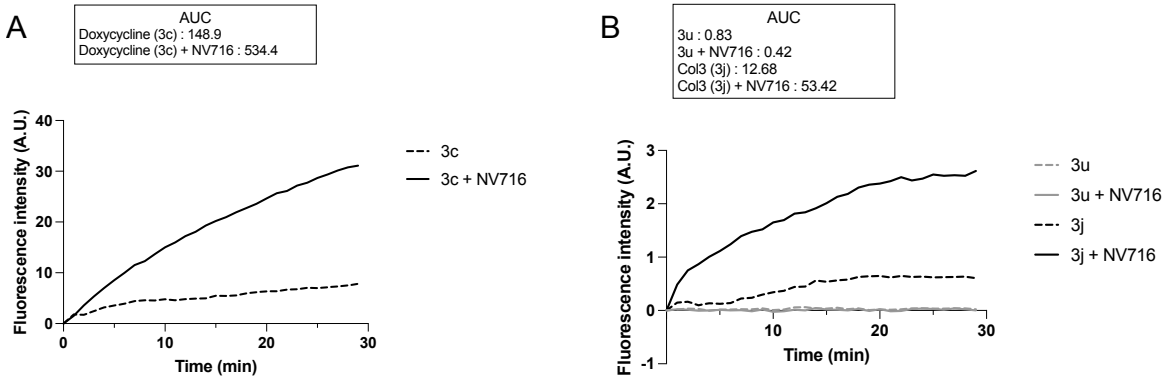


Figure 4. OM disruption by NV716 increases the uptake of some but not all tetracycline derivatives. The concentration of the tested tetracycline derivatives was 100 µM, which was not inhibitory for an OD_{600} ~ 0.6 during the experiment. The concentration of NV716 was added as indicated in Materials and Methods. Increased doxycycline uptake in *P. aeruginosa* PAO1 in the presence of NV716 has been reported and used as a positive control. Due to the difference in the y-axis scale, the uptake of **3c** is shown in (**A**); **3u** and **3j** are shown in (**B**). Bacterial cells without treatment did not show any increase in fluorescence, indicating the absence of intrinsic fluorescence. Fluorescence was monitored as described in Materials and Methods. Data are normalized concerning the fluorescence of individual tetracycline derivatives at time zero. Data are represented as the mean of at least three independent experiments. A. U., arbitrary units.

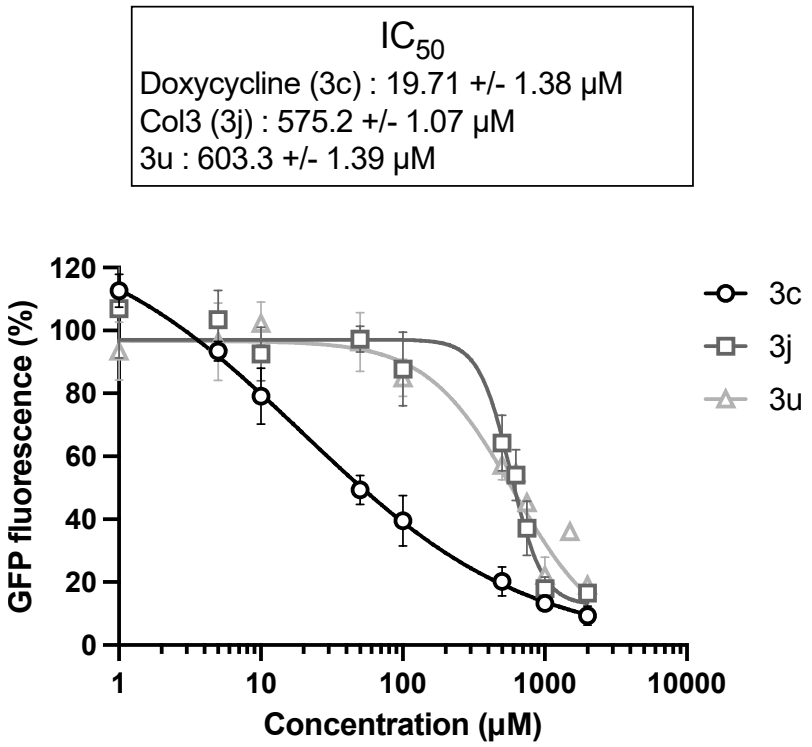


Figure 5. Tetracycline derivatives with different physicochemical properties interfere with protein synthesis in vitro. Inhibition of the synthesis of GFP as a reporter protein was monitored in an *E. coli* cell-free transcription-translation system. Doxycycline is a known inhibitor of protein synthesis and was used as a positive control. Data are represented as the mean of at least three independent experiments, and error bars represent the SD of replicates.

3. Materials and Methods

3.1. Bacterial Strains and Culture Conditions

P. aeruginosa strains PAO1 and PAS263 (PAO1Δ*pvdF*) [40] were used for the experiments. The bacterial cultures were carried out routinely in LB-Miller medium or Mueller-Hinton 2 (MH2) at 37 °C with shaking (160 rpm).

3.2. Reagents

Chlortetracycline (**3a**), demeclotetracycline (**3b**), and doxycycline (**3c**) were purchased from Merck. COL-3 (**3j**) (also named CMT-3, 4-dedimethyl aminosancycline, or incyclinide) was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA). 9-Tert-butyl doxycycline (**3x**) was ordered from Echelon Biosciences Research Labs. DDMC (**3o**), RDOX (**3l**), DDOX (**3k**), and NV716 were synthesized as described previously [34–36]. The procedures for compounds **3g**–**3i**, **3l**–**3n**, **3q**–**3w**, and **3y**–**3ab** were described previously [Rose, C.; Ferrié, L.; Tomas-Grau, R. H.; Zabala, B.; Brunel, J.-M.; Michel, P. P.; Chehin, R.; Raisman-Vozari, R.; Figadère, B. Design and Synthesis of New Non-Antibiotic Doxycyclin Derivatives Against Alpha-Synuclein Aggregation with Anti-Inflammatory Properties. ChemRxiv. https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-n8prz, accessed on 25 April 2023]. Procedures and characterization data for the synthesis of compounds RDMC (**3i**), DDMC (**3o**), RT (**3e**), DCT (**3p**), and RCT (**3d**) are described below.

Synthesis of RDMC (**3i**) and DDMC (**3o**): In a 50 mL round-bottom flask, demeclocycline hydrochloride (500 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv) was suspended in AcOH (50% aqueous) (50 mL), then zinc (powder) (706 mg, 10.0 mmol, 10 equiv) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting solution was filtered through a small pad of Celite with AcOH. The organic phase was extracted with CH_2Cl_2, washed with HCl (1 M) and brine, dried over $MgSO_4$, filtered off, and concentrated in vacuo. The crude mass was 268 mg. Purification with combiflash chromatography [60 g SiO_2, elution 0.5% (acetone + 1% formic acid) in CH_2Cl_2 to 10% over 50 min] afforded DDMC (**3o**) (32 mg) followed by RDMC (**3i**) (97.5 mg). RDMC: ^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) δ 18.47 (s, 1H, C_3-OH), 14.91 (s, 1H, C_{12}-OH), 11.89 (s, 1H, C_{10}-OH), 9.10 (brs, 1H, NH_2), 7.63 (brs, 1H, NH_2), 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H8), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H9), 5.62 (s, 1H, C_{12a}-OH), 4.95 (dd, *J* = 5.6, 2.8 Hz, 1H, H_6), 4.52 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, C_6-OH), 3.23 (dd, *J* = 19.4, 6.4, 1H, H_4), 3.06 (ddd, *J* = 9.8, 6.3, 2.9 Hz, 1H, H_{5a}), 2.65–2.54 (m, 2H, H_4+H_{4a}), 2.25–2.06 (m, 2H, H_5). ^{13}C NMR (101 MHz, Acetone) δ 196.09, 193.94, 193.17, 179.02, 175.27, 162.28, 142.05, 138.00, 123.83, 120.03, 117.11, 105.52, 99.12, 76.45, 66.05, 38.46, 36.95, 35.76, 27.42. HRMS (ESI): calculated for $C_{19}H_{16}ClNO_8$ $[M+H]^+$: 422.0637, found 422.0646.

Synthesis of RT (**3e**): In a 1 L round-bottom flask, tetracycline (10 g, 22.5 mmol, 1.0 equiv) was suspended in AcOH (50% aqueous) (400 mL), then HCl (2.2 mL, 27.0 mmol, 1.2 equiv, 37%) was added, followed by the addition of zinc powder (14.8 g, 225.1 mmol, 10 equiv), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The resulting solution was filtered through a small pad of Celite with AcOH. The organic phase was extracted with CH_2Cl_2, washed with HCl (1 M) and brine, dried over $MgSO_4$, filtered off, and concentrated in vacuo. Purification with combiflash chromatography [300 g SiO_2, elution 0.5% (acetone + 1% formic acid) in CH_2Cl_2 to 10% over 50 min] afforded RT (**3e**) (3.71 g). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 15.31 (s, 1H, C_{12}-OH), 11.88 (s, 1H, C10-OH), 8.97 (brs, 1H, NH_2), 8.70 (brs, 1H, NH_2), 7.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H_8), 7.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H_9), 6.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_7), 6.58 (brs, 1H, C_{12a}-OH), 4.86 (s, 1H, C_6-OH), 3.17 (brd, *J* = 17.9 Hz, 1H, H_4), 2.77 (dd, *J* = 11.0, 5.4 Hz, 1H, H_{5a}), 2.47–2.28 (m, 2H, H_4+H_{4a}), 1.97 (m, 1H, H_5), 1.79 (q, *J* = 12.6 Hz, 1H, H_5), 1.49 (s, 3H, C_6-Me). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 194.85, 192.87, 191.76, 178.11, 173.60, 161.40, 148.08, 136.30, 116.91, 115.22, 114.57, 106.36, 97.4, 74.78, 67.99, 41.88, 35.35, 34.71, 24.89, 22.52. HRMS (ESI): calculated for $C_{20}H_{18}NO_7$ $[M+H-H_2O]^+$: 384.1078, found 384.1082.

Synthesis of DCT (**3p**) and RCT (**3d**): In a 50 mL round-bottom flask, chlortetracycline hydrochloride (500 mg, 0.97 mmol, 1.0 equiv) was suspended in AcOH (10 mL) followed by water (roughly 1 mL) until the dissolution of the product. Then, zinc (powder) (635.4 mg,

9.7 mmol, 10 equiv) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting solution was filtered through a small pad of Celite with AcOH. The organic phase was extracted with CH_2Cl_2, washed with HCl (1 M) and brine, dried over MgSO4, filtered off, and concentrated in vacuo. The crude mass was 275 mg. Purification with combiflash chromatography [60 g SiO_2, elution 0.5% (acetone + 1% formic acid) in CH_2Cl_2 to 10% over 50 min] afforded DCT (**3p**) (35 mg) followed by RCT (**3d**) (165 mg). DCT (**3p**): ^{1}H NMR (300 MHz, Acetone-d_6) δ 18.50 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 14.80 (s, 1H), 12.75 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 3.94–3.82 (dd, *J* = 4.4, 2.0 Hz, 1H), 2.87–2.72 (m, 2H), 2.55 (m, 1H), 2.51–2.44 (m, 1H), 2.39 (dd, *J* = 16.6, 13.7 Hz, 1H), 1.95 (d, *J* = 1.6 Hz, 3H), 1.06 (td, *J* = 12.7, 11.2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, Acetone-d_6) δ 201.89, 197.55, 191.35, 174.85, 169.11, 163.13, 144.43, 141.34, 123.06, 119.35, 116.38, 105.88, 100.01, 72.15, 51.89, 47.79, 39.96, 31.70, 28.59, 27.78. HRMS (ESI): calculated for $C_{20}H_{19}ClNO_7$ $[M+H]^+$: 420.0845, found 420.0850. RCT (**3d**): ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 18.41, (s, 1H, C_3-OH), 15.20 (s, 1H, C_{12}-OH), 12.24 (s, 1H, C_{10}-OH), 8.95 (s, 1H, NH_2), 8.72 (s, 1H, NH_2), 7.52 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_8), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_7), 6.63 (s, 1H, C_{12a}-OH), 5.26 (s, 1H, C_6-OH), 3.16 (brd, 1H, *J* = 15.9 Hz, H_4), 2.86 (dd, *J* = 11.0, 5.4 Hz, 1H,H_{5a}), 2.35-2.47 (m, 2H, H_4+H_{4a}), 2.01 (brd, *J* = 10.8 Hz, 1H, H_5), 1.81 (s, 3H, C_6-Me), 1.70-1.84 (m, 1H, H_5) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-$_{d6}$): δ 194.85, 191.67, 178.84, 173.53, 160.72, 143.72, 139.45, 121.31, 118.71, 118.10, 117.07, 105.39, 97.34, 74.77, 70.43, 42.28, 35.53, 34.75, 25.01, 24.84. HRMS (ESI): calculated for $C_{20}H_{19}ClNO_8$ $[M-H_2O+H]^+$: 418.0688, found 436.0681.

3.3. Potentiation Assays

MICs were conducted in PAO1 in at least three biological replicates following the CLSI protocol. The fold reduction of MIC was determined by dividing the MIC of the antibiotic alone by its MIC in the presence of 10 μM NV716.

3.4. Physicochemical Property Calculations

Structure analysis was conducted and clogD at pH 7.4 was calculated using Marvin Suite, ChemAxon (Budapest, Hungary).

3.5. Accumulation Assays

PAS263 is an isogenic mutant of PAO1 that carries a chromosomal deletion of *pvdF,* which encodes the pyoverdine siderophore. Accumulation assays were performed in PAS263 instead of PAO1, as pyoverdine's spectral properties overlap with those of tetracycline derivatives. Here, bacteria were grown to an exponential phase. The cultures were centrifuged at 6000× *g* for 20 min at 20 °C and the pellets were resuspended in NaPi-$MgCl_2$ buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.4; 2 mM $MgCl_2$) to obtain 0.6 UDO/mL. Tetracycline derivatives and NV716 were used at final concentrations of 100 μM and 10 μM, respectively. For these assays, the order of the addition of the reagents is important to limit the loss of fluorescence recording at time zero. Thus, 10 μL of individual 10X tetracycline derivative solutions, 10 μL of NaPi-$MgCl_2$ buffer or 10X NV716, and 180 μL of bacterial suspensions were added sequentially to the wells of a 96-well microplate with black sides and a clear bottom (Thermo Fisher Scientific, ref. 165305, Illkirch-Graffenstaden, France). An additional well contains bacteria alone. The fluorescence (A. U.) of the tetracycline derivatives was immediately measured every minute for 30 min with a TECAN Spark microplate reader using specific wavelengths for excitation and emission as determined in Supplementary Figure S1. The obtained data were then processed to obtain A. U. = f(t). The fluorescence of the cells alone measured at each time was subtracted for all the conditions tested during the same experiment. Finally, the fluorescence at time zero was subtracted for each time point of each condition. The uptake of tetracycline derivatives was quantified as the area under the curve (AUC) by using GraphPad Prism 6 software. Independent experiments were performed at least three times, and the results are shown as the means of the replicates.

3.6. Bacterial Cell-Free Expression Assays

The effect of the selected tetracycline derivatives (i.e., **3c**, **3j**, and **3u**) on in vitro bacterial protein synthesis was tested using the Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System (Invitrogen for Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). pEXP5-CT TOPO-GFP was used as a template for in vitro transcription–translation. The reactions were performed following the manufacturer's instructions and carried out in 50 µL including the addition of feed buffer at 30 min of incubation to support optimal protein synthesis. Reactions were initiated with 1 µg of plasmid DNA; mixtures were incubated at 30 °C with shaking (300 rpm), and fluorescence was measured after 3 h with a TECAN Spark microplate reader (λex = 475 nm; λem = 520 nm). IC_{50} values were calculated using GraphPad Prism 6 software. Independent experiments were performed at least three times, and the results are shown as the means of the replicates ± SD.

4. Conclusions

New antibacterial discoveries and developments have not kept pace with the spread of resistance. In particular, the membrane impermeability of Gram-negative bacteria represents a major challenge to overcoming the penetration and activity of both existing and new drugs. Perturbation of the OM barrier by chemical or genetic disruption has been shown to increase the sensitivity of Gram-negative bacteria to many antibiotics that are traditionally active against Gram-positive bacteria. Indeed, several groups have published proof-of-concept studies using cationic peptides [23,41], small molecules [26,42], LPS chelators [43], and genetic manipulations [13,44] that support this approach. Despite an upsurge in efforts in this area, as evidenced by reports on the global preclinical antibacterial pipeline, previous studies have mainly focused on studying the effectiveness and characterization of the mode of action of potentiating molecules taken individually [45]. However, this research field lacks studies of the strengths and limits of this approach. In 2020, Eric Brown and colleagues published a comprehensive study to analyze the interaction between OM perturbations and general constraints for effective antibiotic treatment. Interestingly, OM disruption was shown to overcome intrinsic, acquired, and spontaneous antibiotic resistance in *E. coli*, thus validating this approach [46].

The polyaminoisoprenyl compound NV716 was shown to revive old, disused antibiotics such as doxycycline against *P. aeruginosa* [27,30]. In this work, we focused on the impact of OM perturbation caused by NV716 to potentiate the activity of a new series of original tetracycline derivatives in this species. We found that OM disruption increased susceptibility towards hydrophobic compounds; this potentiation of activity was restricted to a specific range of cLogD and reflected an increase in uptake without affecting the affinity to the target.

Other mechanisms, including antibiotic inactivation, target modification, and/or overexpression of multidrug efflux pumps, are also responsible for acquired resistance in Gram-negative pathogens. Thus, we will next seek to study the efficacy of NV716 as an OM disruptor against clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28114262/s1, Figure S1: Excitation and emission spectra of compounds **3c**, **3j**, and **3u**; Figure S2: Structure-activity relationship of tetracyclines; Table S1: List of tetracycline derivatives. Molecules in bold font (**3c**, **3j**, and **3u**) were selected for uptake assays shown in Figure 4 and/or in vitro expression assays shown in Figure 5.

Author Contributions: J.-M.B. and M.M. conceived and designed the experiments; J.-M.B. and M.D. performed the biological experiments; A.P., C.R., L.F. and B.F. designed and conceptualized the tetracycline derivatives; A.P. and C.R. synthesized the tetracycline derivatives; J.-M.B., M.M. and M.D. analyzed the data; L.F., B.F., J.-M.B. and M.M. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.D. was supported by a Ph.D. grant from Synchrotron SOLEIL. We acknowledge France Parkinson (GAO 2018) and the "Fondation Recherche Alzheimer" for financial support for the chemical part of this study.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to Nosopharm for providing the pEXP5-CT TOPO-GFP reporter plasmid and to Isabelle Shalk for gifting PAS263. We thank Patrick P. Michel, ICM, Paris, for sharing Col-3 (**3j**) and 9-*tert*-butyldoxycycline (**3x**). We thank Blandine Seon-Meniel, BioCIS, Université Paris-Saclay, for her help in managing and sending the different tetracyclines. We also thank all members of the MCT laboratory for valuable discussions and manuscript reviewing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

Sample Availability: Samples of the compounds **3d**–**3ab** are available from the authors.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

A. U.	Arbitrary unit
AUC	Area under the curve
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
1,2′-DNA	1,2-Dinaphthylamine
eNTRy	ionizable Nitrogen, low Three-dimensionality, Rigidity
GFP	Green fluorescent protein
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
LPS	Lipopolysaccharides
MIC	Minimal inhibitory concentration
OM	Outer membrane
SD	Standard deviation
WHO	World Health Organization
XDR	eXtremely Drug Resistant

References

1. Brown, E.D.; Wright, G.D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era. *Nature* **2016**, *529*, 336–343. [CrossRef] [PubMed]
2. Shi, Z.; Zhang, J.; Tian, L.; Xin, L.; Liang, C.; Ren, X.; Li, M. A Comprehensive Overview of the Antibiotics Approved in the Last Two Decades: Retrospects and Prospects. *Molecules* **2023**, *28*, 1762. [CrossRef] [PubMed]
3. Theuretzbacher, U.; Bush, K.; Harbarth, S.; Paul, M.; Rex, J.H.; Tacconelli, E.; Thwaites, G.E. Critical Analysis of Antibacterial Agents in Clinical Development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 286–298. [CrossRef]
4. Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis. 2021. Available online: https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240047655 (accessed on 18 March 2023).
5. O'Shea, R.; Moser, H.E. Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2871–2878. [CrossRef] [PubMed]
6. Brown, D.G.; May-Dracka, T.L.; Gagnon, M.M.; Tommasi, R. Trends and Exceptions of Physical Properties on Antibacterial Activity for Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10144–10161. [CrossRef] [PubMed]
7. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 593–656. [CrossRef] [PubMed]
8. Nikaido, H.; Vaara, M. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiol. Rev.* **1985**, *49*, 1–32. [CrossRef]
9. Vergalli, J.; Bodrenko, I.V.; Masi, M.; Moynié, L.; Acosta-Gutiérrez, S.; Naismith, J.H.; Davin-Regli, A.; Ceccarelli, M.; Van Den Berg, B.; Winterhalter, M.; et al. Porins and Small-Molecule Translocation across the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 164–176. [CrossRef]
10. Kojima, S.; Nikaido, H. Permeation Rates of Penicillins Indicate That *Escherichia coli* Porins Function Principally as Nonspecific Channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E2629–E2634. [CrossRef]

11. Eren, E.; Vijayaraghavan, J.; Liu, J.; Cheneke, B.R.; Touw, D.S.; Lepore, B.W.; Indic, M.; Movileanu, L.; Van Den Berg, B. Substrate Specificity within a Family of Outer Membrane Carboxylate Channels. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001242. [CrossRef]
12. Li, X.-Z.; Plésiat, P.; Nikaido, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 337–418. [CrossRef] [PubMed]
13. Krishnamoorthy, G.; Wolloscheck, D.; Weeks, J.W.; Croft, C.; Rybenkov, V.V.; Zgurskaya, H.I. Breaking the Permeability Barrier of *Escherichia coli* by Controlled Hyperporination of the Outer Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 7372–7381. [CrossRef]
14. Krishnamoorthy, G.; Leus, I.V.; Weeks, J.W.; Wolloscheck, D.; Rybenkov, V.V.; Zgurskaya, H.I. Synergy between Active Efflux and Outer Membrane Diffusion Defines Rules of Antibiotic Permeation into Gram-Negative Bacteria. *mBio* **2017**, *8*, e01172-17. [CrossRef] [PubMed]
15. Zgurskaya, H.I.; Rybenkov, V.V. Permeability Barriers of Gram-negative Pathogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2020**, *1459*, 5–18. [CrossRef] [PubMed]
16. Richter, M.F.; Drown, B.S.; Riley, A.P.; Garcia, A.; Shirai, T.; Svec, R.L.; Hergenrother, P.J. Predictive Compound Accumulation Rules Yield a Broad-Spectrum Antibiotic. *Nature* **2017**, *545*, 299–304. [CrossRef]
17. Richter, M.F.; Hergenrother, P.J. The Challenge of Converting Gram-Positive-Only Compounds into Broad-Spectrum Antibiotics: Challenges in Developing Broad-Spectrum Antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1435*, 18–38. [CrossRef]
18. Parker, E.N.; Drown, B.S.; Geddes, E.J.; Lee, H.Y.; Ismail, N.; Lau, G.W.; Hergenrother, P.J. Implementation of Permeation Rules Leads to a FabI Inhibitor with Activity against Gram-Negative Pathogens. *Nat. Microbiol.* **2019**, *5*, 67–75. [CrossRef]
19. Parker, E.N.; Cain, B.N.; Hajian, B.; Ulrich, R.J.; Geddes, E.J.; Barkho, S.; Lee, H.Y.; Williams, J.D.; Raynor, M.; Caridha, D.; et al. An Iterative Approach Guides Discovery of the FabI Inhibitor Fabimycin, a Late-Stage Antibiotic Candidate with In Vivo Efficacy against Drug-Resistant Gram-Negative Infections. *ACS Cent. Sci.* **2022**, *8*, 1145–1158. [CrossRef]
20. Vaara, M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 395–411. [CrossRef]
21. MacNair, C.R.; Tsai, C.N.; Brown, E.D. Creative Targeting of the Gram-negative Outer Membrane in Antibiotic Discovery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2020**, *1459*, 69–85. [CrossRef]
22. Trimble, M.J.; MLynárčik, P.; Kolář, M.; Hancock, R.E.W. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a025288. [CrossRef] [PubMed]
23. Vaara, M. Polymyxin Derivatives That Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics. *Molecules* **2019**, *24*, 249. [CrossRef]
24. Corbett, D.; Wise, A.; Langley, T.; Skinner, K.; Trimby, E.; Birchall, S.; Dorali, A.; Sandiford, S.; Williams, J.; Warn, P.; et al. Potentiation of Antibiotic Activity by a Novel Cationic Peptide: Potency and Spectrum of Activity of SPR741. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00200-17. [CrossRef] [PubMed]
25. Brown, P.; Dawson, M.J. Development of New Polymyxin Derivatives for Multi-Drug Resistant Gram-Negative Infections. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 386–394. [CrossRef]
26. Blanchet, M.; Borselli, D.; Brunel, J.M. Polyamine Derivatives: A Revival of an Old Neglected Scaffold to Fight Resistant Gram-Negative Bacteria? *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 963–973. [CrossRef] [PubMed]
27. Borselli, D.; Lieutaud, A.; Thefenne, H.; Garnotel, E.; Pagès, J.-M.; Brunel, J.M.; Bolla, J.-M. Polyamino-Isoprenic Derivatives Block Intrinsic Resistance of *P. aeruginosa* to Doxycycline and Chloramphenicol In Vitro. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154490. [CrossRef] [PubMed]
28. Borselli, D.; Brunel, J.M.; Gorgé, O.; Bolla, J.M. Polyamino-Isoprenyl Derivatives as Antibiotic Adjuvants and Motility Inhibitors for *Bordetella bronchiseptica* Porcine Pulmonary Infection Treatment. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1771. [CrossRef]
29. Wang, G.; Brunel, J.-M.; Rodriguez-Villalobos, H.; Bolla, J.-M.; Van Bambeke, F. The Polyamino-Isoprenyl Potentiator NV716 Revives Disused Antibiotics against Gram-Negative Bacteria in Broth, Infected Monocytes, or Biofilms, by Disturbing the Barrier Effect of Their Outer Membrane. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114496. [CrossRef]
30. Wang, G.; Brunel, J.-M.; Bolla, J.-M.; Van Bambeke, F. The Polyaminoisoprenyl Potentiator NV716 Revives Old Disused Antibiotics against Intracellular Forms of Infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e02028-20. [CrossRef]
31. Wang, G.; Brunel, J.-M.; Preusse, M.; Mozaheb, N.; Willger, S.D.; Larrouy-Maumus, G.; Baatsen, P.; Häussler, S.; Bolla, J.-M.; Van Bambeke, F. The Membrane-Active Polyaminoisoprenyl Compound NV716 Re-Sensitizes *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics and Reduces Bacterial Virulence. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 871. [CrossRef]
32. Fuoco, D. Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics* **2012**, *1*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
33. Thomas, M.; Le, W.D.; Jankovic, J. Minocycline and Other Tetracycline Derivatives: A Neuroprotective Strategy in Parkinson's Disease and Huntington's Disease. *Clin. Neuropharmacol.* **2003**, *26*, 18–23. [CrossRef]
34. Tomas-Grau, R.; González-Lizárraga, F.; Ploper, D.; Avila, C.L.; Socías, S.B.; Besnault, P.; Tourville, A.; Mella, R.M.; Villacé, P.; Salado, C.; et al. Neuroprotective Effects of a Novel Demeclocycline Derivative Lacking Antibiotic Activity: From a Hit to a Promising Lead Compound. *Cells* **2022**, *11*, 2759. [CrossRef] [PubMed]
35. Tourville, A.; Viguier, S.; González-Lizárraga, F.; Tomas-Grau, R.H.; Ramirez, P.; Brunel, J.-M.; Dos Santos Pereira, M.; Del-Bel, E.; Chehin, R.; Ferrié, L.; et al. Rescue of Dopamine Neurons from Iron-Dependent Ferroptosis by Doxycycline and Demeclocycline and Their Non-Antibiotic Derivatives. *Antioxidants* **2023**, *12*, 575. [CrossRef] [PubMed]
36. Lieutaud, A.; Pieri, C.; Bolla, J.M.; Brunel, J.M. New Polyaminoisoprenyl Antibiotics Enhancers against Two Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria from *Enterobacter* and *Salmonella* Species. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 10496–10508. [CrossRef]

37. Connell, S.R.; Tracz, D.M.; Nierhaus, K.H.; Taylor, D.E. Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3675–3681. [CrossRef]
38. Brodersen, D.E.; Clemons, W.M.; Carter, A.P.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. The Structural Basis for the Action of the Antibiotics Tetracycline, Pactamycin, and Hygromycin B on the 30S Ribosomal Subunit. *Cell* **2000**, *103*, 1143–1154. [CrossRef]
39. Ferreira Junior, N.C.; Dos Santos Pereira, M.; Francis, N.; Ramirez, P.; Martorell, P.; González-Lizarraga, F.; Figadère, B.; Chehin, R.; Del Bel, E.; Raisman-Vozari, R.; et al. The Chemically-Modified Tetracycline COL-3 and Its Parent Compound Doxycycline Prevent Microglial Inflammatory Responses by Reducing Glucose-Mediated Oxidative Stress. *Cells* **2021**, *10*, 2163. [CrossRef]
40. Gasser, V.; Kuhn, L.; Hubert, T.; Aussel, L.; Hammann, P.; Schalk, I.J. The Esterase PfeE, the Achilles' Heel in the Battle for Iron between *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2814. [CrossRef]
41. Hancock, R.E. Peptide Antibiotics. *Lancet* **1997**, *349*, 418–422. [CrossRef]
42. Stokes, J.M.; MacNair, C.R.; Ilyas, B.; French, S.; Côté, J.-P.; Bouwman, C.; Farha, M.A.; Sieron, A.O.; Whitfield, C.; Coombes, B.K.; et al. Pentamidine Sensitizes Gram-Negative Pathogens to Antibiotics and Overcomes Acquired Colistin Resistance. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17028. [CrossRef]
43. Hancock, R.E.; Wong, P.G. Compounds Which Increase the Permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *26*, 48–52. [CrossRef] [PubMed]
44. Klobucar, K.; French, S.; Côté, J.-P.; Howes, J.R.; Brown, E.D. Genetic and Chemical-Genetic Interactions Map Biogenesis and Permeability Determinants of the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *mBio* **2020**, *11*, e00161-20. [CrossRef] [PubMed]
45. Theuretzbacher, U.; Outterson, K.; Engel, A.; Karlén, A. The Global Preclinical Antibacterial Pipeline. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 275–285. [CrossRef] [PubMed]
46. MacNair, C.R.; Brown, E.D. Outer Membrane Disruption Overcomes Intrinsic, Acquired, and Spontaneous Antibiotic Resistance. *mBio* **2020**, *11*, e01615-20. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.